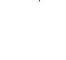
Глава 5

Транслокации внутриклеточного транспорта лекарств

Трудности системного моделирования в немалой степени предопределены разобщенностью наших взглядов и совершенным несовпадением трактовок одного и того же явления или процесса с точек зрения разных специалистов, представляющих различные биомедицинские науки. Кусочек ткани человека или животного, разделенный на части и розданный для исследования морфологу, физиологу, биохимику и физхимику, будет изучен, проанализирован и описан так, что один из них не поймет другого и всех остальных. При этом подобный результат никого из них не удивляет и ничего странного в этом, казалось бы, нет, так как язык и методы науки складывались исторически. Но в начале XXI века странным является именно то, что этот факт не представляется странным.



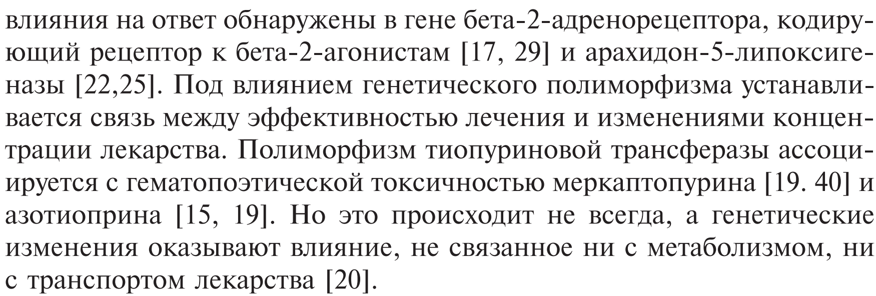
Наметившаяся интеграция биомедицинских наук ломает междисциплинарные «берлинские стены» и дает возможность получать не только морфофункциональные, но и морфогенетические, морфобиохимические, морфофармакологические закономерности целостного организма, что ранее было просто немыслимо.

Биологическое правдоподобие и унитропность лекарств

Существуют общие проблемы изучения рецепторных ассоциаций, именуемые *биологическим правдоподобием* [1, 50]. Высокая эффективность лекарств, связанная с однонуклеотидным полиморфизмом, ассоциированным с их низкой концентрацией в плазме, является причиной задержки лекарств в клеточных депо. Сверхэкспрессия генов некоторых белков-транспортеров (ABCC4 или MRP4) указывает на устойчивость к некоторым лекарствам [31].

Эффективность действия лекарств зачастую прямо зависит от генетических вариантов клеточных рецепторов [1, 3]. Варианты прямого





влияния на ответ обнаружены в гене бета-2-адренорецептора, кодирующий рецептор к бета-2-агонистам [17, 29] и арахидон-5-липоксигеназы [22,25]. Под влиянием генетического полиморфизма устанавливается связь между эффективностью лечения и изменениями концентрации лекарства. Полиморфизм тиопуриновой трансферазы ассоциируется с гематопоэтической токсичностью меркаптопурина [19. 40] и азотиоприна [15, 19]. Но это происходит не всегда, а генетические изменения оказывают влияние, не связанное ни с метаболизмом, ни с транспортом лекарства [20].

Другим примером могут стать генетические вариации клеточного транспорта ионов с непрямой ролью в предрасположенности к токсическому эффекту лекарств [21]. Пациенты с вариантными аллелями транспортеров натрия или кальция могут быть наиболее подвержены заболеванию или смерти в результате синдрома удлиненного Q-T интервала, индуцированного лекарством [21]. Генетический полиморфизм в гене аполипопротеина Е, похоже, имеет определенное значение в эффективности терапии болезни Альцгеймера, в частности – ответе на лекарства, понижающие уровень липидов крови [22, 25, 32, 48]. Так, у пациента с сердечной аритмией, развившейся вследствие приема кларитромицина, была идентифицирована мутация в гене KCNE2, ответственном за интеграцию мембранных субъединиц, которые собираются HERG в форме кальциевых каналов [13].




Вариантные последовательности KCNE2 имеют 1,6% популяции. Их наличие может привести к смерти при приеме определенных лекарств. Поэтому они являются кандидатами для разработки стратегии предупреждения серьезных осложнений действия лекарств, связанных с их транспортом. Приведенные примеры могут быть расширены и дополнены, но их цель в другом.

NB! Эти процессы протекают во вполне конкретных морфологических структурах, где их можно не только оценить и *измерить*, но и *увидеть*, что существенно приближает нас к *биологическому правдоподобию* в фармакомоделировании и фармакотерапии.

В клетках биологических объектов существует протяженная замкнутая мембранная структура, построенная из сообщающихся трубкообразных полостей и мешочков, называемых цистернами, которая сообщается с внешней ядерной мембраной. Это система *эндоплазматического ретикулума* (ЭР), которая имеет две подсистемы в виде шероховатого (ШЭР) и гладкого (ГЭР) ЭР. В ШЭР синтезируются белки, которые будут функционировать в составе мембран, лизосом или секретироваться из клетки. Эти белки остаются внутри ШЭР в виде мембранных белков или переносятся *с помощью везикул* [11] в ап-



парат Гольджи. Везикулы образуются почкованием мембран, а затем сливаются с ними. Белки переносятся везикулами в лизосомы, цитоплазматические мембраны или секреторные пузырьки. Последние, сливаясь с плазматической мембраной, высвобождают свое содержимое (*экзоцитоз*). Эти процессы могут быть *конститутивными,* или *регуляторными,* то есть управляться химическими сигналами.

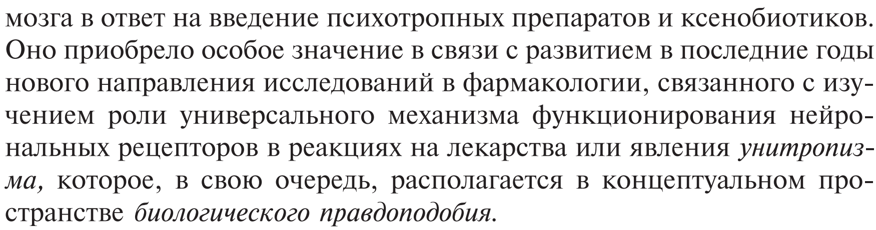
Биосинтез липидов осуществляется ферментами, закрепленными на мембранах ГЭР (фосфолипиды и холестерин, стероидные гормоны). В ГЭР локализованы также процессы метаболической *трансформации ксенобиотиков,* в которые вовлечена система *цитохрома Р-450.* ГЭР является депо ионов Ca^{2+}, поддерживающего низкий уровень Ca^{2+} в цитоплазме, а в его мембранах локализованы управляемые Ca^{2+}-связывающими белками Ca^{2+}-каналы и энергозависимые Ca^{2+}-насосы.

NB! Воистину, лучше один раз увидеть! Если существует достаточно унифицированное рецепторное пространство, то должен быть и его морфофункциональный субстрат. А если наличествует и он, то какова его реакция на действие лекарств и ксенобиотиков? И какие ожидаемые клинические проявления?

Тем более что в области психофармакологии существует мощная «тектоническая» платформа на доклиническом уровне исследований. По собственному желанию ею не подвигаешь, и единственным критерием оценки реального психотропного эффекта новых веществ является клиническая практика, подтвержденная и обоснованная на уровне фундаментальных исследований, включая субклеточный уровень.

В 1974 г. Нобелевская премия по физиологии и медицине была присуждена Дж.Э. Паладе, Клоду и Кристиану Де Дюву «за открытия, касающиеся структурной и функциональной организации клетки». Это стало возможным в основном благодаря описанному Дж.Э. Паладе процессу синтеза белка. В начале 1950-х гг. в биологии преобладала *теория клеточного транспорта* веществ через мембраны, в основе которой лежали представления о порах, согласно которой ионы и крупные молекулы проникают в клетку через поры мембраны (плазмолеммы). Дж. Э. Паладе предложил вместо теории пор – *везикулярную теорию.* Полученные им электронные микрофотографии показали, что ионы и крупные молекулы из внеклеточного пространства, скорее всего, поглощаются везикулами (пузырьками), которые периодически выделяются из мембраны клетки.

Ультраструктурные исследования, посвященные влиянию психотропных препаратов на ЦНС, единичны и обычно ограничиваются изучением какой-то одной области головного мозга. Это и определило изучение нами изменений различных ультраструктурных образований



мозга в ответ на введение психотропных препаратов и ксенобиотиков. Оно приобрело особое значение в связи с развитием в последние годы нового направления исследований в фармакологии, связанного с изучением роли универсального механизма функционирования нейрональных рецепторов в реакциях на лекарства или явления *унитропизма,* которое, в свою очередь, располагается в концептуальном пространстве *биологического правдоподобия.*

Развитие психофармакологии и создание новых групп психотропных средств, когда все усилия экспериментаторов направлены на поиск их существенных различий, неизбежно привело к вопросу об общности их влияния на психику. Иными словами, существует ли биологический, морфофункциональный субстрат для единого психотропного эффекта лекарств и есть ли хоть что-то общее в их действии, что позволило бы на основе объективных признаков объединить их в группу «психотропных средств»? Ранее [11] мы дали определение этому явлению на основе принципов H.Spenser'а [50].



NB! В наиболее общем виде психоунитропизм проявляется во вполне конкретных изменениях психической деятельности, характере и эффектах тех или иных психотропных препаратов вне зависимости от особенностей их воздействия на отдельные субстратно-биологические мишени головного мозга как материальной основы психики.



Понимание общих принципов открыло бы новые перспективы (см. также гл. 6–9) направленного поиска психотропных средств с заранее заданными свойствами, например, с влиянием на волевые функции, на самокритику, на «социализацию» субъектов и т д.

В связи с этим нами было предпринято изучение воздействия ряда препаратов – галоперидола, диазепама, амитриптилина, фенамина, пирацетама и уридина, а также новых биологически активных соединений, обладающих антидепрессивным: гидрохлорид-2,4-дифенин-3-(N-норфолинометил)-4H-хромен – *адепрес,* нейролептическим: гидрохлорид-2-фенил-3-(N-пипередино-метил)-4-метил-4H-хромен – *психолепт* действием, препарата *глюпепт* (пептид, полученный из мицелия гриба *Poliporus squatosus* во ВНИИ синтезбелок) и *психогал* (3,4-метилендиоксифенилизопропиламин) – вещества, по действию близкого *глюпепту.*

Материал для электронно-микроскопического исследования (кусочки сенсомоторной коры, гиппокампа, гипоталамуса, мозжечка, ЦСВ – центрального серого вещества вокруг Сильвиева водопровода, полосатого тела) брались у самцов крыс линии Wistar в различные промежутки времени после глутаросмиевой фиксации, готовились по общепринятой методике и заключались в эпон 812. В части случаев

блоки ориентировали, для чего полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окрашенные толуидиновым синим и азуром II, изучали в световом микроскопе. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротомах LKB 12-14, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-700LF.

В главе 5 на микрофотографиях приняты следующие обозначения: Ас – астроцит, ВЛ – вторичная лизосома, ГМК – гладкомышечная клетка, Гр – гранулярный ретикулум, Д – дендрит, М – митохондрия, МВ – миелинизированное волокно, МВТ – мультивезикулярное тельце, МКВ – микроворсинка, Н –нейрон, ОАс – отросток астроцита, ОВ – окаймленная везикула, Ол – олигодендроцит, ПА – просвет артериолы, ПК – пластинчатый комплекс, ПКА – просвет капилляра, ПЛ – первичная лизосома, СП – синаптический пузырек, СПЦ – субповерхностная цистерна, ША – шипиковый аппарат, Э – announcement эписома, ЭК – эндотелиальная клетка, Я – ядро, Яд – ядрышко, Ях –ядерный хроматин.

Транспортные механизмы эндоцитоза

Многие эндогенные и экзогенные вещества, белки, гормоны, лекарства, токсины и целые рецепторные группировки активно перемещаются внутри клеток. Ряд лекарств и токсинов обладает высокой цитотоксической активностью для клеток млекопитающих. Попадания *одной молекулы* в цитозоль достаточно, чтобы вызвать *гибель клетки* или включить процесс *апоптоза*. Токсины и иные вещества группы рибосоминактивирующих белков второго типа (РИБ II) состоят из двух субъединиц: каталитической (*A*) и лектиновой (*B*). *A*-субъединица (active) обеспечивает цитотоксический эффект, а *B*-субъединица (binding) – связывание ксенобиотиков с рецепторами на поверхности клеток. Механизм действия РИБ II заключается в избирательном выщеплении остатка аденина из 28S-рРНК эукариот, результатом чего является остановка белкового синтеза.

Процесс проникновения в клетку начинается с взаимодействия связывающей *B*-субъединицы с галактозосодержащими рецепторами, после чего происходит интернализация лекарства, ксенобиотика или токсина внутрь клетки путем рецепторопосредованного эндоцитоза. Затем лекарства и токсины в составе везикул проходят эндосомальные компартменты клетки, аппарат Гольджи и достигают эндоплазматического ретикулума, где происходит их диссоциация на отдельные субъединицы. Цитотоксическое действие РИБ II позволяет моделировать дизайн инновационных лекарств и цитостатиков для



лечения аутоиммунных, онкологических и психоневрологических заболеваний.

NB! Поскольку в ряду исследованных нами веществ оказались и «классические» психотропные средства и новые, полученные путем направленного синтеза (*адепрес, психогал, психолепт*), и растительные рибосоминактивирующие пептиды РИБ II психотомимического действия (*глюпепт*), представилась возможность проверить на конкретных фактах концепцию психоунитропизма.

Эффективность конъюгатов можно регулировать изменением их внутриклеточного транспорта. Например, при конструировании рекомбинантных иммунотоксинов и их конформационных изменений возможно использование состояния расплавленных глобул, которое предшествует *транслокации* вещества через мембрану внутриклеточных везикул [14], с участием клеточных рецепторов, содержащих галактозу и маннозные рецепторы [49].





В качестве показателя общих адаптационных принципов перестройки в рамках *концепции унитропизма* мы можем констатировать факт повышенного везикулообразования в нервных клетках, причем особого внимания заслуживают так называемые «*окаймленные пузырьки*». Среди находящихся рядом везикулярных структур они выделяются наличием *опушения* и обычно электронно-прозрачны, хотя иногда содержат гомогенный материал с различной электронной плотностью. Окаймленные везикулы чаще всего выявляются в зоне пластинчатого комплекса, но могут наблюдаться и свободно лежащими в цитоплазме (рис. 5.1, 5.2). Здесь уместно заметить, что в мозге они характерны *только для нейронов* и принадлежат к числу относительно редких находок, тогда как в клетках других органов это обычное явление.

По своей сути – это *эндоцитоз*, который является транспортным процессом, позволяющим интернализовать внеклеточные вещества с образованием пиноцитозных везикул за счет инвагинации сегмента плазматической мембраны с захватом внеклеточных молекул.

NB! Если сегмент мембраны отшнуровывается, то образует изолированную *везикулу*, в которой особую роль играет специфический белок – *клатрин* (рис. 5.1). Он локализован на цитоплазматической стороне мембраны в месте эндоцитозного выпячивания («окаймленная ямка» или «окаймленная везикула»).

Везикулы сливаются с лизосомами и образуют вторичные лизосомы (эндосомы), в которых при участии лизосомальных гидролитических ферментов происходит разрушение биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, липопротеидов) до более простых соединений – аминокислот, моносахаридов, нуклеотидов и др. Эти мо-

лекулы могут вновь использоваться клеткой для синтеза новых соединений, подвергаться катаболизму или же выводиться из нее путем экзоцитоза.

NB! Эндоцитоз в широком понимании обозначает различные типы захвата внеклеточного материала внутрь клетки, включающие фагоцитоз, интернализацию с помощью кавеол, макро- и микропиноцитоза, *клатрин-независимого* и *клатрин-зависимого* рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Интернализация лигандов проходит двумя последними механизмами [1, 8, 43]. Существует реальность *клатрин-зависимого* эндоцитоза, с помощью которого в клетку также попадают различные лекарства, транспортные белки, например трансферрин, гормоны, факторы роста [26, 27], а также возможность *клатрин-независимого* пути интернализации [31, 42]. Увеличение числа окаймленных везикул мы наблюдали в нейронах всех изученных отделов, за исключением клеток гипоталамуса. По современным представлениям, окаймление из белка – *клатрина* – имеет отношение к транслокационным транспортным процессам. Опосредованный рецепторами эндоцитоз всегда ассоциируется со специфическим взаимодействием лигандов, например, с плаз-

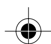






Рис. 5.1.Появление многочисленных окаймленных везикул в цитоплазме нейрона и субповерхностных цистерн у плазмолеммы. В нижней части рисунка – формирование крупной окаймленной везикулы (стрелка) (ув. 65 000)

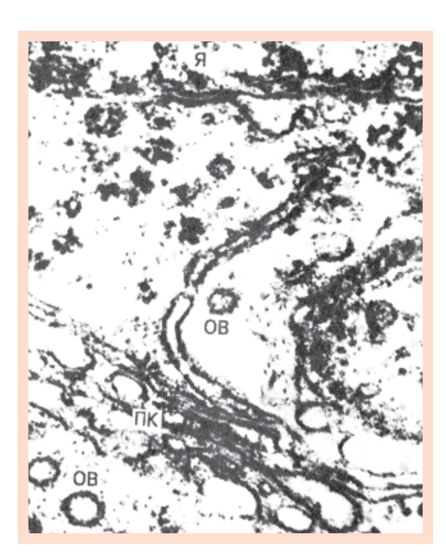


Рис. 5.2 Появление большого числа окаймленных везикул в зоне пластинчатого комплекса (ув. 68 000). Окаймленные визикулы электронно-прозрачны и имеют «портретное» сходство в виде опушения

молеммой нейронов в месте нахождения рецепторов, состоящих из гликопротеидов.

NB! Следующий этап – проникновение лиганда только через особые участки мембраны (*окаймленные углубления*), которые быстро инвагинируют в клетку во время эндоцитоза, в результате чего и образуются окаймленные пузырьки, своеобразные везикулярные контейнеры – носители лиганда или пептида (рис. 5.2).

По мере продвижения их в цитоплазму нейрона они теряют клатриновую оболочку и сливаются друг с другом или везикулами иного типа, образуя более крупные пузырьки с гладкой поверхностью, называемые эндосомами, или рецепторосомами [1, 2, 4, 16, 23]. Без специальных методов исследования эти этапы так называемой интернализации остаются «за кадром», а электронно-микроскопически удается лишь регистрировать большое количество окаймленных везикул в зоне пластинчатого комплекса (рис. 5.1, 5.3) или на пути к нему (рис. 5.1). Эта система опосредованного рецепторами эндоцитоза представляется наглядно реальной и иллюстрирует внутриклеточный путь лекарств, в том числе и психотропного препарата.

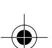




Рис. 5.3. Влияние психотропного препарата на пластинчатый комплекс. В зоне пластинчатого комплекса прослеживается система (стрелка), где происходит разобщение окаймленной части CURL (носитель лиганда) и тубулярного фрагмента (рециклирующий рецептор) (ув. 37 000)



По-видимому, в клатринзависимый процесс вовлекаются те мембранные белки, которые образуют агрегаты с гликосфинголипидными рецепторами [34]. Сборка *клатрин-окаймленных везикул* – многостадийный процесс, включающий несколько регуляторных факторов, среди которых GTP-аза ARF-1, фосфолипаза D [28]. Взаимодействия белков на цитоплазматической поверхности мембраны концентрируют молекулы рецептора в окаймленных везикулах.

Часть рецепторов конститутивно располагаются в клатрин-окаймленных везикулах (например, low density lipoprotein receptor или LDLR), а другие концентрируются в них только после связывания с лигандом (например, EGF receptor или Fc рецептор II типа). Специфическая адресация рецеп-

торов в клатринокаймленные ямки осуществляется за счет взаимодействия цитоплазматической части рецепторов, на которых располагаются сигнальные мотивы. Подобные сигналы имеют определенным образом организованную структуру, а их длина включала не менее 7 аминокислот. Сама сигнальная последовательность белков сложена в *сжатую петлю* (tight turn) [16, 23].

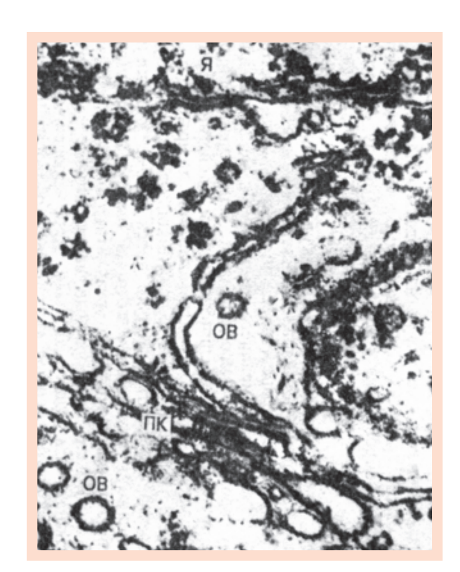
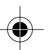


Рис. 5.4. Увеличение количества окаймленных везикул, сочетающееся с одновременной активацией аппарата протеолиза (ув. 32 000), характерно для любого психотропного препарата, а также для пока «непсихотропных» средств, которые могут ими стать

Сигнальная последовательность необходима для взаимодействия со специальными *белками-адаптерами*, которые участвуют в формировании клатриновой оболочки.

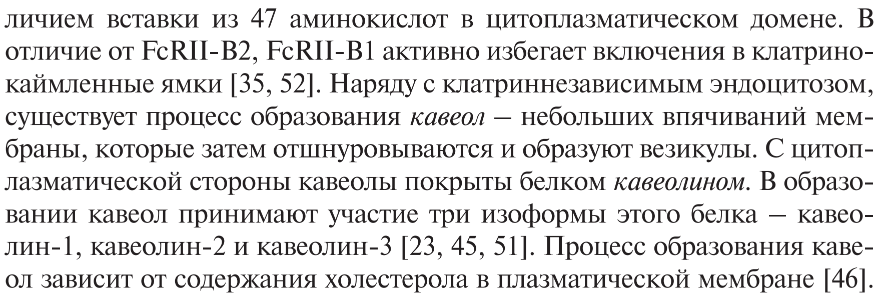



NB! Существует четкая зависимость между содержанием в цитоплазме окаймленных везикул и активацией протеолиза. Чем больше вазикул в клетке, тем интенсивнее активация протеолитических процессов, о чем можно судить по наличию многочисленных вторичных лизосом (аутофаголизосом) (рис. 5.4).

При клатрин-зависимом эндоцитозе в минуту с клеточной поверхности исчезает 10-50% белков, связывавшихся с рецепторами. В течение минуты после отпочковывания клатриновой везикулы интернализуемые молекулы обнаруживаются в сортирующих эндосомах. В то же время интернализация с помощью неклатринового механизма составляет 50% от общего объема эндоцитоза. Возможно, что индукция неклатринового механизма происходит в условиях ингибирования клатринового пути [34, 41].

Система CURL и адаптерные белки

Ряд поверхностных рецепторов избегает включения в клатринокаймленные ямки [37]. Это показано в исследованиях эндоцитоза двух изоформ Fc рецепторов: FcRII-B1 и FcRII-B2, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. FcRII-B1 отличается от FcRII-B2 на-



личием вставки из 47 аминокислот в цитоплазматическом домене. В отличие от FcRII-B2, FcRII-B1 активно избегает включения в клатрино-каймленные ямки [35, 52]. Наряду с клатриннезависимым эндоцитозом, существует процесс образования *кавеол* – небольших впячиваний мембраны, которые затем отшнуровываются и образуют везикулы. С цитоплазматической стороны кавеолы покрыты белком *кавеолином*. В образовании кавеол принимают участие три изоформы этого белка – кавеолин-1, кавеолин-2 и кавеолин-3 [23, 45, 51]. Процесс образования кавеол зависит от содержания холестерола в плазматической мембране [46].

Методы электронно-микроскопического анализа [2, 8, 9, 10, 52] позволили получить данные о судьбе рецепторов и лигандов и наблюдать везикулярно-тубулярную систему, получившую название *CURL* (от англ. Compartment of uncoupling of receptor and ligand – место разделения рецепторов и лиганда). С нашей точки зрения, наиболее примечательным является то, что данная система CURL оказывается универсальной и подходит не только к гликопротеиду с терминальной галактозой, но и действует в случае других лигандов и рецепторов [24]. Действительно, мы смогли наблюдать описанную ранее систему CURL, которая, по нашему мнению, является фрагментом пластинчатого комплекса (рис. 5.3). Как видно на схеме (рис. 5.43), в окаймленной части, по-видимому, находится лиганд (психотропный препарат), а в тубулярной – рециклирующий рецептор. В дальнейшем везикулярная часть сольется с первичной лизосомой и в процессе деградации пептида на составляющие аминокислоты образуют аутофаголизосомы, а тубулярная часть перенесет рецепторы в плазмолемму нейрона для утилизации их при связывании новых молекул психотропных препаратов.




Мы предполагаем, что в некоторых случаях кинетика связывания лиганда с рецептором и механизмы передачи сигнала жестко не детерминированы и, по-видимому, могут проходить по «запасному пути». Так, обнаруженное нами перемещение мультивезикулярных телец к аппарату Гольджи в зоне максимальной концентрации окаймленных везикул, возможно, связано с сортировкой комплексов пептид-рецептор, заключенных в везикулярные контейнеры, часть которых транспортируется по запасному пути.

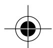
Клатрин состоит из трех тяжелых и трех легких цепей, которые образуют «треножник». Ассоциация молекул клатрина между собой приводит к формированию сетчатой структуры, состоящей из пента- или гексагональных ячеек. В результате формирования клатриновой сетки вокруг участка плазматической мембраны происходит инвагинация участка внутрь клетки. Связывание клатрина с мембраной происходит за счет специальных адаптерных *белков-адаптинов* (АР).

NB! Адаптерные белки – это гетеротетрамеры, которые направляют мембранный рецептор в клатрин-окаймленные ямки, углубления на поверхности мембраны.

Эндоцитозные везикулы содержат адаптерный комплекс AP-2. Везикулы, производные мембран сети транс-Гольджи, содержат AP-1, а в эндосомах клеток млекопитающих найден тетрамерный комплекс AP-3 [34, 38].

AP-1 обнаруживается в клатрин-окаймленных ямках в TGN, а AP-2 ассоциируется с клатрином плазматической мембраны. *Комплекс клатрин–AP-2* формируется на внутренней стороне мембраны из цитоплазматических белков. В образовании комплекса участвуют регуляторные белки, к которым относятся *динамин* и несколько белков, гомологичных Src 3 домену (SH3). Процесс формирования клатриновой оболочки требует энергетических затрат [47].

В клетках, мутантных по динамину, ксенобиотики и токсины продолжали интернализоваться клатрин-независимым путем, но движение белка к аппарату Гольджи (АГ) было заблокировано [30]. Транспорт ксенобиотиков в АГ не зависит от низкого эндосомального pH везикул, циркулирующих между ранними и поздними эндосомами [33, 42, 43, 44].



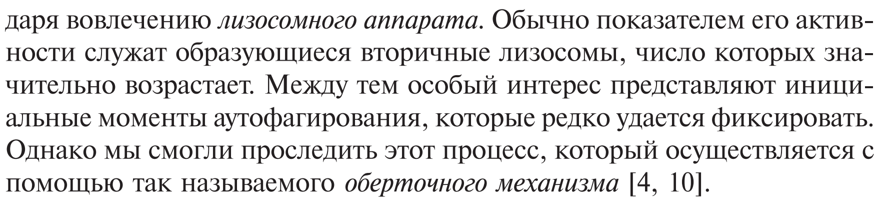


NB! Нами установлено, что специфический захват психотропных препаратов нейронами различных отделов головного мозга сопровождается поглощением значительной части плазмолеммы за счет образования окаймленных везикул в результате опосредованного рецепторами эндоцитоза.

В случае чрезмерного везикулообразования, индуцированного специфическим или неспецифическим эндоцитозом, создается своего рода дефицит поверхности клетки («минус-мембрана»), который еще более усугубляется, например, в случае образования миелиноподобных структур. В цитоплазме клеток существует специальный механизм возврата рецепторов, направленный на восстановление и поддержание клеточной поверхности [10, 24].

Особого внимания заслуживает тот факт, что процессы опосредованного рецепторами эндоцитоза и образование миелоподобных структур синхронизированы с появлением субповерхностных цистерн. Последние локализуются под плазмолеммой нейронов и образуют «пакет» из параллельно расположенных гладких мембран. Высказано предположение, что наличие субповерхностных цистерн указывает на развитие компенсаторных реакций, повышение метаболической и функциональной активности в дендритах [36, 52].

Поврежденные мембраны и органеллы, продукты распада, различные включения и т.д. удаляются их цитоплазмы нервных клеток благо-



даря вовлечению *лизосомного аппарата*. Обычно показателем его активности служат образующиеся вторичные лизосомы, число которых значительно возрастает. Между тем особый интерес представляют инициальные моменты аутофагирования, которые редко удается фиксировать. Однако мы смогли проследить этот процесс, который осуществляется с помощью так называемого *оберточного механизма* [4, 10].

Так, при участии мембран цитоплазматической сети сначала происходит окружение поврежденной митохондрии и образование *аутофагосомы*. Сегрегированный участок цитоплазмы, подлежащий деградации, в дальнейшем подвергается действию протеолитических ферментов, находящихся в неактивном состоянии в первичных лизосомах. Это становится возможным в том случае, если происходит слияние аутофагосом и первичных лизосом с образованием вторичных лизосом аутофагического типа.

Субмикроскопические механизмы антидепрессантов




Введение *адепреса* в дозе 25 мг/кг веса в первые 30 мин вызывает усиление образования окаймленных везикул, особенно в сенсомоторной коре. Максимальной выраженности эндоцитоз достигает через 3 ч в нейронах гиппокампа и ЦСВ, однако он несколько снижается в клетках коры. Через сутки интенсивность специфического взаимодействия вновь повышается в структурах коры и мозжечка, а в нейронах гиппокампа и ЦСВ не отличается по выраженности от контроля. Колебаниям в образовании окаймленных везикул соответствует формирование субповерхностных цистерн: процессы активации специфического эндоцитоза коррелируют с упомянутой выше перестройкой мембран, «идущих» на восполнение нейрональной плазмолеммы. В то же время известно, что клинические проявления антидепрессивного эффекта возникают только после 2-3-недельного курса лечения.

NB! В методологическом плане не вполне правомерно экстраполировать данные, полученные при однократном фармакологическом воздействии в эксперименте, на процессы, развивающиеся при длительном применении психотропного средства в клинике.

Поэтому в случае использования имипрамина препарат вводили в течение 5 дней. Как и в экспериментах с *адепресом*, инъекции *имипрамина* в дозе 5 мг/кг вызывали усиленный эндоцитоз, особенно выраженный в нейронах сенсомоторной коры и гиппокампа и менее интенсивный в нервных клетках хвостатого ядра. Интернализация *адепреса* приводит к незначительным изменениям митохондрий в нейронах сен-

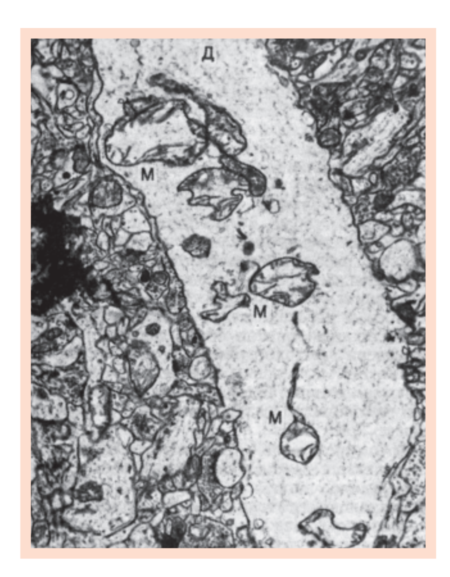
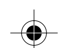


Рис. 5.5. Набухание и деление митохондрий в дендрите (ув. 7000)

сомоторной коры и более выраженным сдвигам в дендритах в виде набухания и деления органелл (рис. 5.5). В гиппокампе и ЦСВ альтерации этих органелл ограничиваются лишь набуханием, а в мозжечке органеллы остаются интактными. Спустя сутки во всех изученных отделах митохондрии были такими же, как и в контроле.

В ядрах также наблюдаются изменения – от инвагинаций кариолеммы до фрагментации, а иногда отмечается выход ядрышка. Через 3 ч некоторые повреждения ядер нивелируются, что указывает на обратимый характер реактивных изменений генома. Вместе с тем на основании наших наблюдений можно полагать, что ядра нейронов ЦСВ и клеток Пуркинье мозжечка более чувствительны к *адепресу*, чем ядра нейронов других отделов головного мозга. Процессы активации в ядрышках более стойки и удерживаются на протяжении суток. Таким образом, изменения *белоксинтезирующего аппарата* отражают состояние функционального напряжения и могут быть следствием непосредственного действия *адепреса* на обмен белков в нейронах.



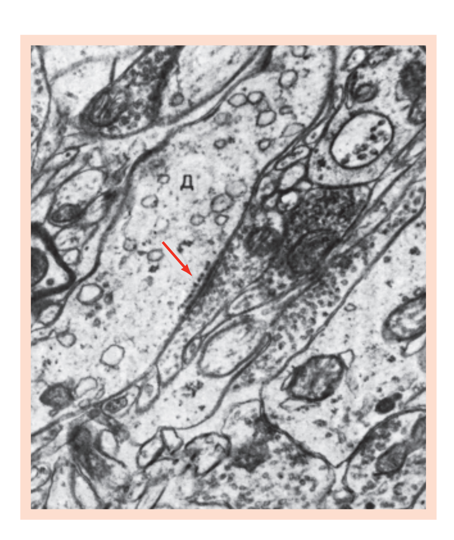



Рис.5.6. Появление субсинаптической полоски (стрелка) в аксодендрическом синапсе (ув. 14 000)

Усилению специфического эндоцитоза, независимо от используемого препарата, соответствует активация лизосомного аппарата нервных клеток и увеличение числа мультивезикулярных телец, в которых происходит деградация интернализованного материала. Другой причиной усиления внутриклеточного цитолиза является повреждение мембранных структур.



Спустя 30 мин после введения *адепреса* почти все аксонные терминали содержат многочисленные синаптические пузырьки. В аксодендритических синапсах ЦВС иногда удается обнаружить так называемую *субсинаптическую полоску* (рис. 5.6) Последняя представляет собой специализированную структуру, состоящую из электронно-плотных телец, располагающихся непосредственно у синаптической мембраны. Обилие синаптических везикул в терминалях нередко сочетается с присутствием многочисленных митохондрий в аксоплазме (рис. 5.7). Интересно, что они, как правило, выглядят интактными, тогда как в постсинаптических элементах митохондрии нередко повреждены.

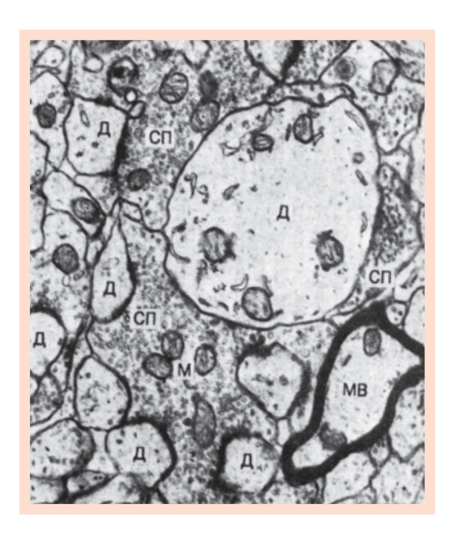


Рис.5.7. Появление многочисленных синаптических везикул и митохондрий в аксоплазме (ув. 14 000)




Через сутки во всех изученных отделах патологические нарушения синаптического аппарата отсутствуют, однако отчетливых изменений числа везикул установить не удалось. Наряду с аксонными терминалями, переполненными пузырьками, встречаются почти пустые нервные окончания. Эта закономерность не распространяется на синаптические контакты в мозжечке. Ультраструктурные реакции на препарат проявляются расширением цистерн ретикулума в астроцитах коры и гиппокампа. На серийных срезах удалось обнаружить место перехода узких трубочек в широкие лакуны, заполненные веществом с низкой электронной плотностью (рис. 5.8).



Рис. 5.8. Переход цистерн ретикулума в широкие лакуны (стрелки), заполненные веществом с низкой электронной плотностью (ув. 9000)

Таким образом, проникая в определенных количествах через гематоэнцефалический барьер, *адепрес* и *имипрамин* достигают нейронов и интернализуются в цитоплазму в местах окаймленных углублений. Далее в составе окаймленных везикул они проходят преимущественно лизосомный путь деградации и одновременно влияют на межнейрональные контакты. Судя по ультраструктурной перестройке, метаболизм антидепрессантов в организме завершается в течение суток после заключительного введения и характеризуется представленной выше картиной изменений.

Постсинаптическое действие нейролептиков

Изучение изменений различных образований мозга в ответ на введение *галоперидола* в дозе 3 мг/ кг веса приобретает особое значение в связи с развитием в последние годы нового направления в психофармакологии – анализа роли нейрональных рецепторов в реакциях на некоторые психотропные препараты [5, 6].

Ультраструктурные исследования влияния *галоперидола* на ЦНС единичны и обычно ограничивались изучением какой-то одной области головного мозга. Так, в корковом отделе двигательного анализатора идентифицировались процессы внутриклеточной регенерации, а первоначальное угнетающее действие на поведение животных связывали с нарушением межнейрональных связей в различных отделах коры больших полушарий.

Несмотря на определенные достижения в проблеме рецепторно-лигандных взаимоотношений, мы не исключаем из программы научного поиска альтернативность в постановке вопроса о роли каких-то других молекулярно-биохимических и ультраструктурных последствий эндоцитоза.

NB! Нервные клетки в процессе длительной эволюции выработали свой уникальный, присущий только им, внутриклеточный механизм компенсации мембран, расходуемых при опосредованном рецепторами эндоцитозе, в том числе ксенобиотиков и лекарств.

Действительно, прослеживается определенная зависимость между образованием окаймленных телец и формированием субповерхностных цистерн. Селективный перенос препарата везикулярными «контейнерами» удерживается на высоком уровне, на протяжении первых 3 часов, и именно в этот период отмечается ответная реакция в виде образования субповерхностных цистерн, которые спустя сутки уже не выявляются [6].

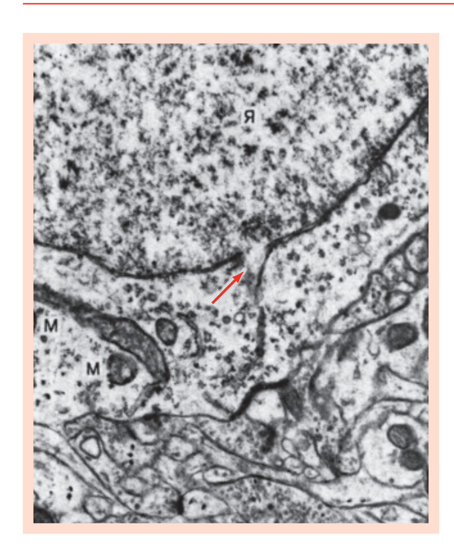


Рис. 5.9. Фрагмент звездчатого нейрона. Появление дефекта в ядерной оболочке (стрелка) (ув. 10 000)

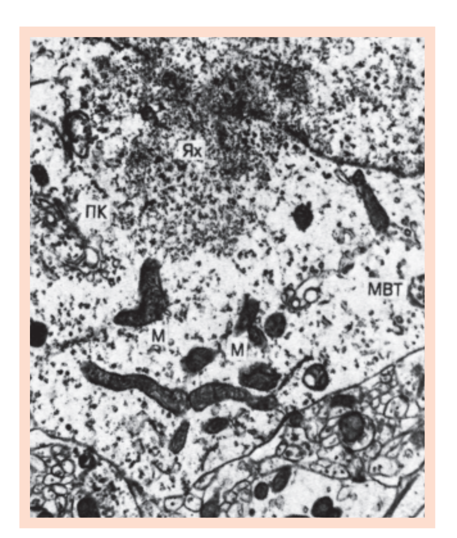
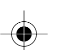


Рис. 5.10. Выход ядерного хроматина в цитоплазму нейрона (ув. 5600)





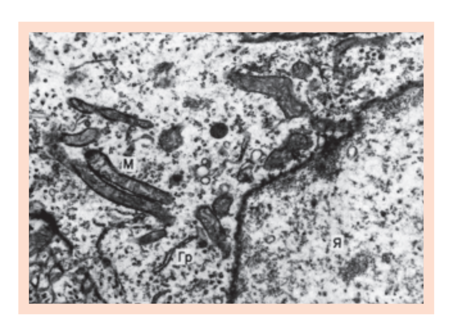


Рис. 5.11. Появление диад митохондрий в цитоплазме нейрона (ув. 7000)

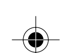
В нервных клетках сенсомоторной коры, гиппокампа и ЦСВ чаще регистрируется *гиперхроматоз*, в нейронах таламуса – иногда умеренный очаговый или периферический *хроматолиз.* В первом случае обращают на себя внимание перинуклеарные скопления рибосом, особенно заметные в области инвагинации кариолеммы, во втором – количество рибонуклеопротеидных частиц уменьшается и редуцируются цистерны гранулярного ретикулума.

Кариотропное действие препарата сохраняется на протяжении всех периодов наблюдения. В частности, в ядерной оболочке увеличивается не только число пор, но и их размеры (рис. 5.9), наблюдается выход ядерного хроматина (рис. 5.10)

Особенно заметна активация ядрышка в кариолемме. В нейронах всех изученных отделов митохондрии выглядят осмиофильными, кристы не всегда прослеживаются вследствие высокой плотности матрикса. Количество органелл в первые 30 мин после введения *галоперидола* увеличено в основном в перинуклеарной области, в от-



Рис. 5.12. Локализация диад митохондрий в дендрите (ув. 5600)



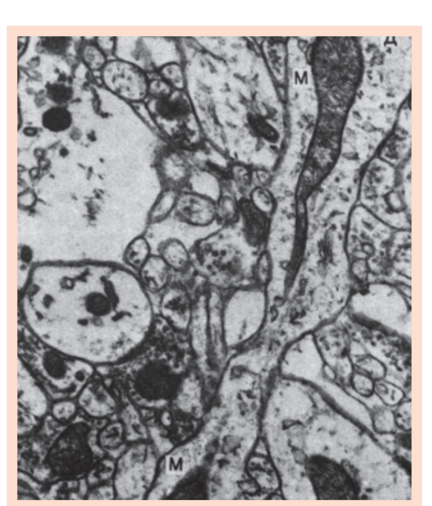


Рис. 5.13. Деление митохондрий в дендрите (ув. 10 000)

ростках органеллы немногочисленны (рис. 5.11). Через 3 часа в цитоплазме нейронов митохондрий становится меньше, тогда как в аксонах и дендритах содержание их возрастает. Через сутки сохраняется направленность сдвигов предыдущего периода с той или иной разницей, в отдельных отростках митохондрий становится много (рис. 5.12). Качественные изменения характеризуются появлением органелл причудливой формы.

Нарушение соотношений количества митохондрий скорее всего связано с перемещением их из цитоплазмы в отростки. Мы получили доказательства такого транспорта благодаря идентификации в нейронах «митохондриальных диад», то есть пар органелл, тесно контактирующих между собой (рис. 5.11). Аналогичные ассоциации прослеживаются через сутки в дендритах (рис. 5.12).



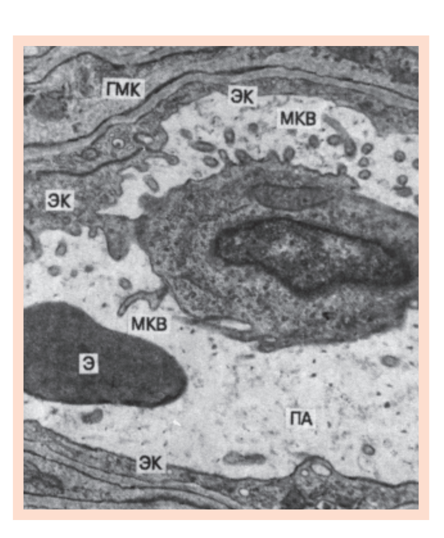
NB! Подобные картины – своеобразные индикаторы аксо- и дендроплазматического транспорта. По аксону среднего диаметра в день проходит примерно 1000 митохондрий.

Количество митохондрий в дендроплазме может изменяться за счет их деления (рис. 5.13). В первые 3 ч в дендритах резко уменьшается количество микротрубочек или они вообще не выявляются, что указывает на разрушение тубулина, составляющего их основу (рис. 5.12 и 5.13). Структура микротрубочек восстанавливается обычно через сутки.

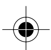
Что касается реакции клеток нейроглии, то она наиболее выражена в астроцитах. Наиболее примечательны образующиеся в большом количестве аутофаголизосомы (вторичные лизосомы). Обычно активация протеолитического аппарата начинается через 30 мин после введения *галоперидола*, становится максимальной через 3 ч и лишь незначительно снижается к началу первых суток. Интересно, что только в ЦНС удалось обнаружить незначительные ультраструктурные изменения в олигодендроцитах. Эти изменения в других отделах мозга отсутствовали.

В сосудах сенсомоторной коры и таламуса какие-либо повреждения не выявлены. Первые признаки изменения эндотелиоцитов (образование микроворсинок, клазматоз, микропиноцитоз) регистрируются лишь через сутки в гиппокампе и особенно выражены в ЦСВ. В капиллярах и артериолах, как правило, отмечается выраженный клазматоз микроворсинок. Кроме того, наблюдается ампутация фрагментов цитоплазмы эндотелиоцитов или даже целых клеток. При этом слущиванию предшествует выпячивание в просвет цитоплазмы с ядром так, что остается только узкий цитоплазматический мостик (рис. 5.14).





5.14. Артериола, в просвете которой видна десквамированная эндотелиальная клетка (ув. 7000)



Таким образом, следует обратить внимание на стереотипную организацию клеток. Введение *галоперидола* приводит к образованию окаймленных везикул и активации внутриклеточных структур. Кариотропное действие препарата распространяется на все изученные образования мозга. Некоторые временные особенности реагирования нервных и глиальных клеток объясняются различиями проницаемости гематоэнцефалического барьера, количеством специфических рецепторов и совершенством межнейрональных связей. Кроме того, *галоперидол* обладает способностью разрушать микротрубочки в первые часы после введения [6].

Для изучения морфологического «выражения» функциональных изменений нейронов и межнейрональных связей в головном мозге мы использовали *психолепт* в дозе 50 мг/кг веса, вызывающей изменение

поведения у экспериментальных животных (крысы). В частности, применение производного 4H-бензхроменов позволило изучить не только формирование дистрофических, но, главное, и функционально обусловленных изменений нервных структур всех компонентов клеточного тела. Введение *психолепта* в дозе 50 мг/кг вызывало дремотное состояние, ослабевали ответные реакции на действие внешних раздражителей. При электронно-микроскопическом исследовании сенсомоторной коры прослеживается отчетливое кариотропное действие препарата, проявляющееся в резкой инвагинированности ядерной оболочки, активации ядрышка и смещении его к кариолемме. В далеко зашедших случаях можно наблюдать фрагментацию ядер. Другие изменения, связанные с реакцией энергетического и протеолитического аппаратов нервных клеток, являются следствием взаимодействия *психолепта* с соответствующими рецепторами на нейрональной плазмолемме.

Особенностью воздействия *психолепта* является резкое уменьшение количества микротрубочек (вплоть до полного исчезновения) в дендритах (рис. 5.15). Действительно, при этом в дендроплазме обычно удается выявить единичные микротрубочки, локализирующиеся, как правило, у плазматической мембраны клеточных отростков. Что касается синаптических контактов на телах и отростках нейронов, то обычно они в сенсомоторной коре не изменяются (рис. 5.15). Однако синаптическая передача в зоне контактов может нарушаться вследствие *альтерации микротрубочек*, которые, по современным представлениям, связаны с нейрональными рецепторами и образуют с ними единичный рецепторно-скелетный комплекс. Анализ разнообразных и многочисленных интернейрональных контактов позволил нам установить, что в аксоплазме обычно содержатся в большом количестве синаптические везикулы и практически не измененные митохондрии (рис. 5.15).





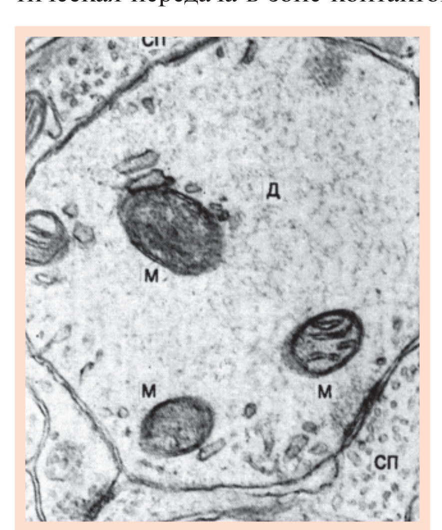


Рис. 5.15. Редукция микротрубочек в дендрите (ув. 20 000)

Таким образом, в результате введения *психолепта* в первую очередь происходят сдвиги в нейрональных структурах, связанных с синтезом белка. Кроме того,

препарат дестабилизирует микротрубочковый аппарат дендритов, что в свою очередь отражается на механизмах синаптической передачи и может тем самым обусловливать нейролептическое действие *психолепта.* Поскольку *психолепт* снижает функциональную активность сенсомоторной коры, структурно и функционально тесно связанной с хвостовым ядром и гиппокампом, то в наших дальнейших исследованиях особое внимание обращалось именно на эти образования мозга.



Рис. 5.16. Дегенерация по темному типу пресинаптического отростка (ув. 25 000)

В нейронах хвостатого ядра сохраняется направленность сдвигов, характерных для клеток сенсомоторной коры. Повреждения в них сочетают элементы реактивных и адаптивных изменений. Однако по сравнению с корой к функциональным изменениям в нейронах хвостатого ядра присоединяются незначительные нарушения дистрофического характера, регистрируемые в отдельных астроцитах. Увеличение количества митохондрий в дендритах объясняется как увеличением транспортных процессов в клетках, так и делением этих органелл. Значительно реже в структурах гиппокампа отмечаются необратимые повреждения. Если очаговая дегенерация цитоплазмы нейронов встречается в виде исключения, то в пресинаптических окончаниях эти находки становятся более частыми (рис 5.16). Деструкция синапсов по темному типу (т.е. необратимый тип повреждения) характеризуется повышением электронной плотности преси-

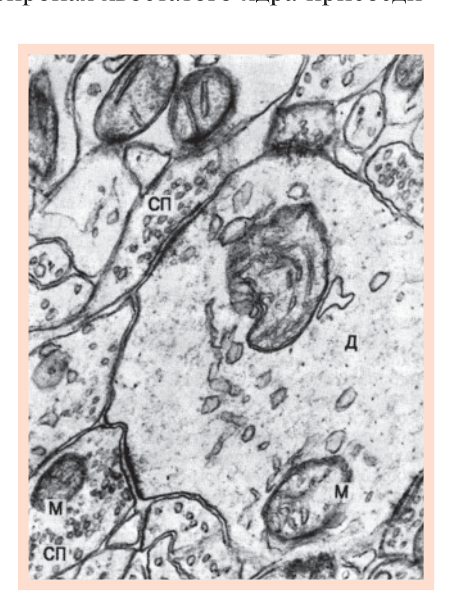
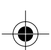


Рис. 5.17. Многочисленные аксодендритические контакты (ув. 20 000)

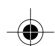



напса, резким уменьшением количества синаптических везикул и осмофилией митохондрий.

NB! Финалом дегенеративного процесса под влиянием психолепта является полный распад синапса и его фагоцитоз астроцитом.

По-видимому, в ответ на такого рода альтернативные сдвиги синаптоархитектоники в порядке компенсаторной реакции устанавливаются новые взаимоотношения между нейронами, когда на дендрите, лишенном микротрубочек, удается идентифицировать от 1 до 5 и более аксодендритических контактов (рис. 5.17).

Итак, независимо от отдела мозга после введения препарата регистрируются сходные изменения. После специфического взаимодействия с рецепторами на нейрональной плазме (этот этап одинаков по своим ультраструктурным проявлениям с другим, возникающим под влиянием галоперидола) *психолепт* интернализуется в цитоплазму и оказывает отчетливое кариотропное действие. Другим, не менее характерным признаком повреждения является деструкция микротрубочек в дендритах.




Влияние анксиолитиков на нейроглиальные взаимоотношения

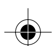
Поскольку именно для нервной ткани показателем специфического взаимодействия любого лиганда с рецепторами служит реакция образования окаймленных везикул, свидетельствующая об *опосредованном рецепторами эндоцитозе*, особое внимание мы обращали именно на этот аспект исследования. Вместе с тем изучались ультраструктурные изменения нервных и глиальных клеток, гематоэнцефалического барьера и сдвиги в аппаратах нейропередачи после введения *диазепама* в дозе 5 мг/кг.

Оказалось, что интенсивность специфического эндоцитоза в нейронах различных участков головного мозга (сенсомоторная кора, гиппокамп, ЦСВ, мозжечок) постепенно нарастает на протяжении 3 ч и снижается через сутки. Соответственно динамике образования окаймленных везикул перестраивается компенсаторная реакция, связанная с формированием субповерхностных цистерн.

Резюмируя общие представления о бензодиазепиновых рецепторах, следует в первую очередь выделить существование двух типов рецепторных белков, а также признать возможность локализации рецепторов на клетках астроглии. В настоящее время не известно, какой из типов бензодиазепиновых рецепторов связан с плазмолеммой астроцитов и как они изменяются под влиянием *диазепама*, но сам факт

их наличия достаточно хорошо визуализируется, подтверждая суть *биологического правдоподобия*.

В астроцитах сенсомоторной коры мы наблюдали окаймленные везикулы на всех сроках исследования. Если учесть, что пузырьки с дополнительной оболочкой в клетках астроглии вообще отсутствуют, то все варианты образования их там являются результатом специфического взаимодействия *диазепама* с бензодиазепиновыми рецепторами. Более того, уже спустя 30 мин после инъекции препарата удается наблюдать момент его интернализации, т.е. образование окаймленного углубления. В астроцитах гиппокампа в первые 30 мин окаймленные везикулы не обнаружены, однако через 3 часа количество их резко возрастает и значительно чаще регистрируются окаймленные углубления (рис. 5.18). К концу срока наблюдения количество окаймленных везикул такое же, как в астроцитах сенсомоторной коры. В клетках астроглии ЦСВ реакция опосредованного рецепторами эндоцитоза по выраженности занимает промежуточное положение между таковой в коре и гиппокампе. В первые 30 мин случаи образования окаймленных везикул и углублений отмечаются примерно одинаково (рис. 5.19).




На высоте действия препарата видны исключительно окаймленные везикулы, которые спустя сутки исчезают. Интересно отметить, что в астроцитах мозжечка они ни разу не были зарегистрированы.

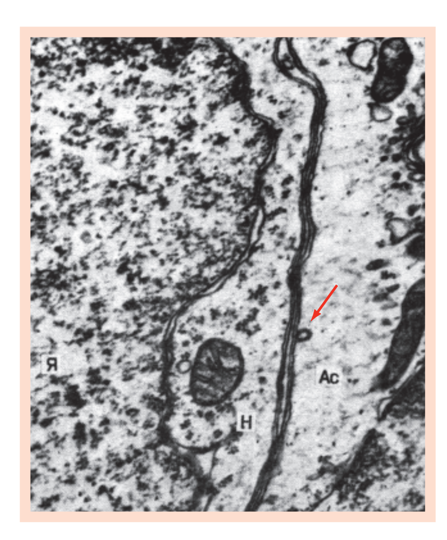


Рис. 5.18. Появление окаймленных везикул (стрелка) в цитоплазме астроцита (ув. 7000)

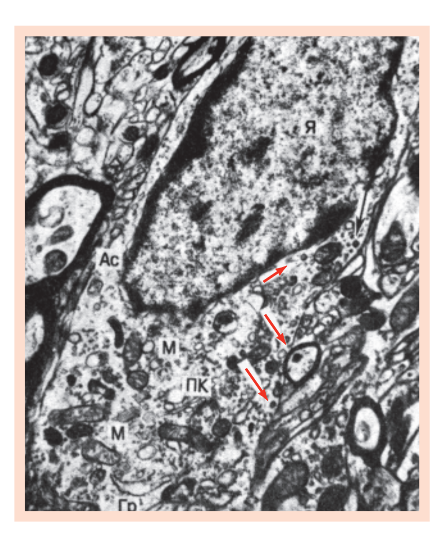


Рис. 5.19. Формирование окаймленного углубления (стрелки) из плазмолеммы астроцита (ув. 14 000)

Отмеченные особенности формирования опосредованного рецепторами эндоцитоза при интернализации *диазепама* клетками астроглии, по-видимому, имеют региональные закономерности, связанные с различным количеством бензодиазепиновых рецепторов в изученных отделах головного мозга (рис. 5.20).

NB! Как показали результаты наших исследований, основная масса бензодиазепиновых рецепторов сосредоточена на *плазмолемме астроцитов гиппокампа*, далее в порядке убывания по этому показателю идут ЦСВ, сенсомоторная кора и мозжечок (рис. 5.21).



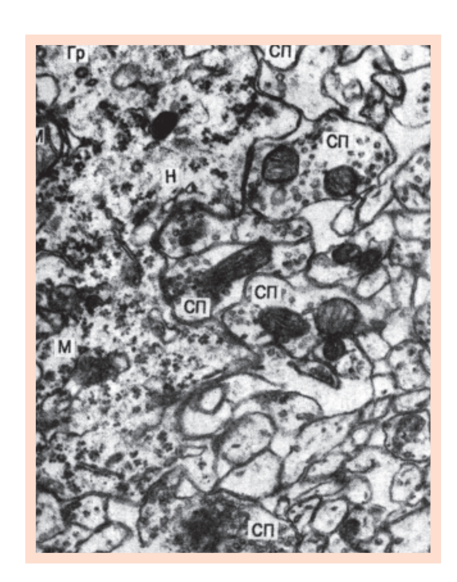
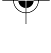


Рис. 5.20. Многочисленные синапсы с различным содержанием синаптических везикул в аксоплазме (ув. 18 000)



Рис. 5.21. Дегенерация по темному типу в аксодендрическом синапсе (ув. 10 000)

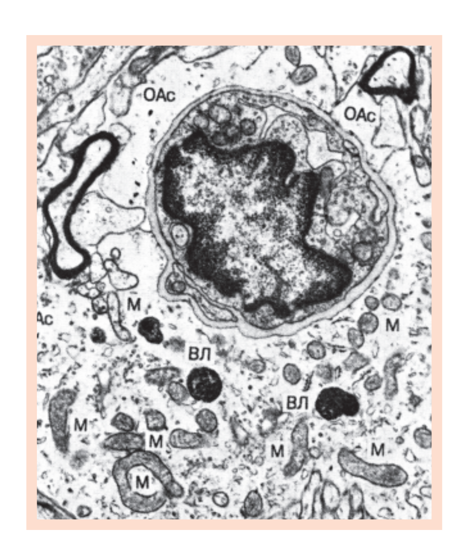


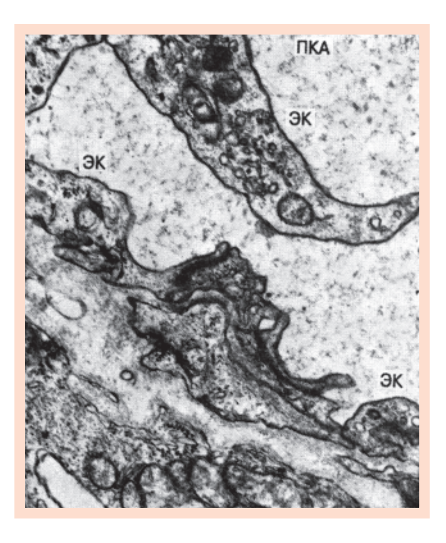
Таким образом, на основании полученных результатов можно не только доказать, но и увидеть наличие бензодиазепиновых рецепторов на поверхности нервных и глиальных клеток и о специфическом взаимодействии с ними *диазепама*.

Ультраструктура капилляров в различных отделах мозга не претерпевает существенных изменений, если не считать ситуаций, когда эндотелиальные клетки содержат крупное ядро и многочисленные митохондрии, благодаря чему сужается просвет (рис. 5.22). По-видимому, подобное состояние может вызвать ограниченные нарушения гемомикроциркуляции, реологические сдвиги и неблагоприятно отразиться как на самой сосудистой стенке, так и на прилежащих фун-

кциональных элементах изученных участков мозга. Во всяком случае, реакция на *диазепам* в отдельных наблюдениях распространяется на неклеточный компонент базального слоя, который бывает локально расширен и разрыхлен.

Более того, цитоплазматические выросты эндотелиальных клеток, образующие микроворсинки, как правило, подвергаются *клазматозу* и свободно лежат в просвете. Иногда отторгается часть цитоплазмы эндотелиоцита, имеющего такую же плотность и набор органелл, как в большинстве эндотелиальных клеток (рис. 5.23). Через 24 ч они в большинстве своем идентичны ультраструктуре капилляров у контрольных животных. В этот срок лишь единичные эндотелиальные клетки имеют инвагинированные ядра, а перициты содержат вторичные лизосомы.





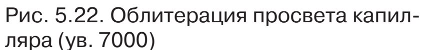
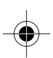

Рис. 5.22. Облитерация просвета капилляра (ув. 7000)

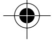
Рис. 5.23. Клазматоз эндотелиальной клетки (ув. 14 000)

Следовательно, совокупность указанных нарушений, не вызывая необратимых сдвигов в системе микроциркуляции, тем не менее, лабилизирует сосудистую стенку и повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера.

NB! Анализируя результаты влияния *диазепама* на различные структуры мозга, отметим, что нам удалось визуализировать факт наличия специфических *бензодиазепиновых* рецепторов на *нейронах* и *астроцитах* (специфический эндоцитоз не выявлен лишь в астроцитах мозжечка), как возможную модель для анксиолитиков.

С нашей точки зрения, принципиально важным моментом является одна немаловажная деталь – реакция компенсаторного характера, возникающая в ответ на «минус-мембрану», связанную с образованием окаймленных везикул, которая реализуется только в нейронах в виде формирования субповерхностных цистерн. Последние в астроцитах отсутствуют, несмотря на выраженный опосредованный рецепторами эндоцитоз. Это подчеркивает уникальность наблюдаемого феномена и распространенность его во всех типах нервных клеток. Кроме того, транквилизаторы, подобно нейролептикам и психостимуляторам, способствуют развитию новых форм нейроглиальных взаимоотношений, связанных с прямыми коммуникациями между нейронами и астроцитами.





Два нейрональных компартмента для уридина

При внутрибрюшинном введении *уридина* в дозе 50 мг/кг в сенсомоторной коре в первые 30 мин регистрируются нейроны, практически не отличающиеся от таковых у контрольных крыс [4, 11]. Однако уже в этот период встречаются нервные клетки с большим количеством окаймленных везикул и субповерхностных цистерн (рис. 5.24).

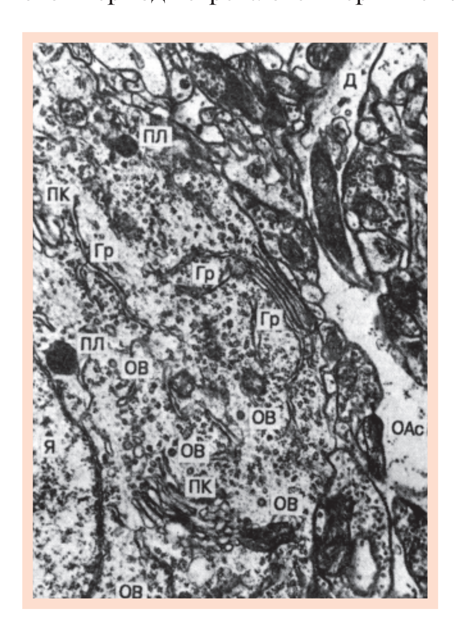


Рис. 5.24. Фрагмент нейрона, в цитоплазме которого находятся многочисленные окаймленные везикулы. У нейрональной плазмолеммы видна субповерхностная цистерна (ув. 10 000)

Иногда встречаются клетки, в которых нет окаймленных везикул, что позволяет допустить отсутствие у них *уридиновых рецепторов*. Считают, что появление окаймленных везикул связано со специфическим взаимодействием введенного лиганда с рецепторами и последующей интернализацией его в цитоплазму в результате опосредованного рецепторами эндоцитоза. Поскольку при этом на построение везикул расходуется часть нейрональной плазмолеммы, восстановление ее, по-видимому, может осуществляться за счет субповерхностных цистерн [4, 10, 11].

В клетках нейроглии документируются реактивные изменения. Заслуживают внимания струк-

турно-функциональные взаимоотношения между клетками нейроглии и нейронами. В случаях периферического хроматолиза имеют место контакты различной протяженности между нервными клетками и олигодендроцитами, откуда нуклеопротеидный материал поступает в цитоплазму нейроцитов (рис. 5.25).

Судя по ультраструктурной перестройке нейронов и сателлитной глии, в первые 3 ч транспорт РНК происходит из олигодендроцитов, а через 24 ч – преимущественно из астроцитов. Капилляры и сосудистые отростки астроцитов не изменены, лишь в отдельных эндотелиальных клетках отмечается микроплазматоз. В нейронах гиппокампа через 30 мин и 3 ч после введения *уридина* резко возрастает число окаймленных везикул. Одновременно происходит активация аппарата энергетического и протеинового синтеза. Митохондрии в цитоплазме набухают, в дендритах видны фигуры их деления. Увеличено содержание рибосом и полисом, в ядрах по 2-3 ядрышка, и они смещаются к кариолемме. Через сутки изменения менее интенсивны.

Подобная закономерность отмечается и в работе синаптического аппарата. Заслуживает внимания тот факт, что именно в гиппокампе иногда регистрируется дегенерация синапсов по темному (процесс необратим) или по светлому (обратимые изменения) типу (рис. 5.26). Оба типа патологических нарушений синаптоархитектоники неспе-



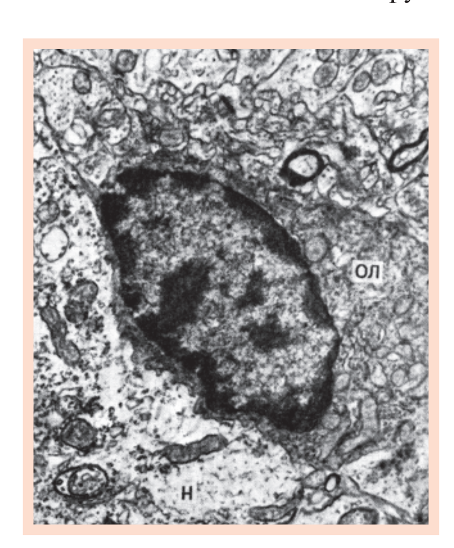



Рис. 5.25. Контакт между нейроном и олигодендроцитом. В нервной клетке обнаруживается периферический хроматолиз (ув. 7000)



Рис. 5.26. Дегенерация по темному типу в аксодендритическом синапсе (ув. 18 000)

цифичны и вызывают состояние асинапсии, которая ранее была описана при различных состояниях. Независимо от действующего этиологического фактора, повреждения межнейрональных связей, несомненно, отражаются на интегративной деятельности ЦНС. В эндотелии капилляров гиппокампа, как и в эндотелиоцитах таламической области наблюдаются окаймленные везикулы. В глиальных клетках отмечаются в основном реактивные изменения.

В нервных клетках самые ранние изменения связаны с интернализацией *уридина* и проявляются в деформации ядер, увеличении количеств первичных лизосом, повышении электронной плотности митохондрий и цитоплазматического матрикса в целом (рис. 5.26). Окаймленные везикулы многочисленны, находятся в зоне пластинчатого комплекса и инвагинациях кариолеммы. Выявленная тенденция ультраструктурных сдвигов регистрируется с незначительными колебаниями в течение суток. В синапсах видны утолщения контактирующих мембран, увеличение числа синаптических пузырьков и концентрация их в области зон, где происходит выделение медиатора. Через 3 ч функциональная активность синапсов заметно снижается и остается на одном уровне в течение суток.

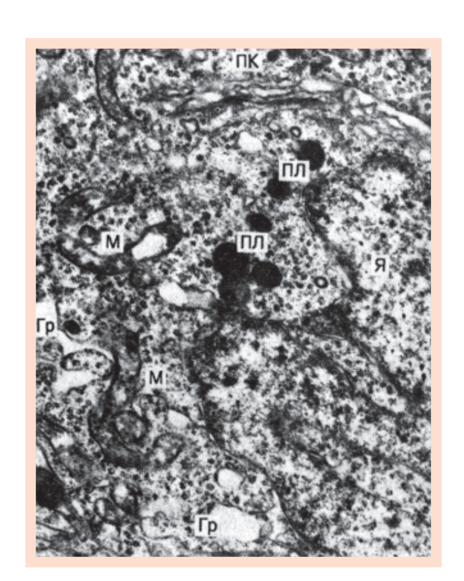
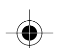


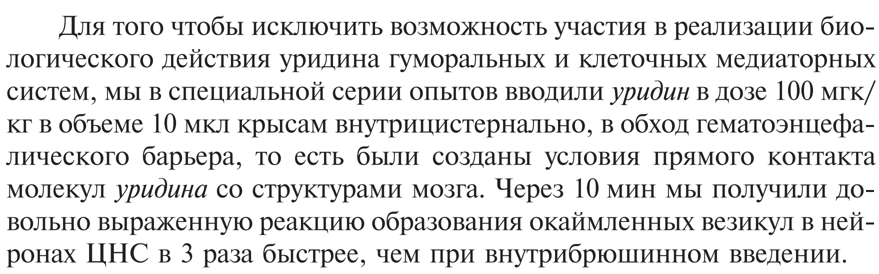
Рис. 5.27. Фрагмент цитоплазмы нейрона с набухшими митохондриями, многочисленными лизосомами, расширенными цистернами ретикулума и глубокими инвагинациями в ядре (ув. 10 000)



NB! Наиболее существенным результатом настоящего исследования является возможность идентификации нейронов двух типов, различающихся по способности образовывать окаймленные везикулы в ответ на введение уридина.

Наличие или отсутствие уридиновых рецепторов на плазматической мембране нервных клеток может обусловливать сложную функциональную мозаику нейрональной активности и неоднозначность реакций на этот лиганд. Взаимодействие молекул уридина с внутриклеточными структурами вызывает в последних реактивные изменения, которые в различные периоды последействия препарата сопровождаются сдвигами адаптивного и дезадаптивного характера (рис. 5.27).





Для того чтобы исключить возможность участия в реализации биологического действия уридина гуморальных и клеточных медиаторных систем, мы в специальной серии опытов вводили *уридин* в дозе 100 мгк/кг в объеме 10 мкл крысам внутрицистернально, в обход гематоэнцефалического барьера, то есть были созданы условия прямого контакта молекул *уридина* со структурами мозга. Через 10 мин мы получили довольно выраженную реакцию образования окаймленных везикул в нейронах ЦНС в 3 раза быстрее, чем при внутрибрюшинном введении.

Спустя 30 мин сохраняется направленность сдвигов, наблюдавшихся в предыдущий период, а в астроцитах наблюдаются расширенные цистерны цитоплазматической сети, многочисленные лизосомы и «вытолкнутые» ядрышки, что не наблюдается при внутрибрюшинном введении. Для сравнения отметим, что этот феномен постоянно регистрируется в цитоплазме нейронов ЦНС через 3 ч после введения *пирацетама* и через 3 и 24 ч при введении *галоперидола*. Выход ядрышек мы рассматриваем в качестве адаптивной реакции в ответ на недостаток рибонуклеопротеинов в цитоплазме нейронов.




Если при внутрибрюшинном введении уридина проницаемость гематоэнцефалического барьера повышается постепенно, то в данной серии опытов она становится максимальной уже через полтора часа. В клетках сателлитной нейроглии возникают реактивные изменения. Характерной особенностью, присущей синаптическим образованиям, является активация синаптического аппарата.

Таким образом, внутрицистернальное введение уридина «решает» принципиальной важности вопрос о возможности прямого взаимодействия молекул *уридина* со специализированными локусами на плазмолемме нервных клеток. Благодаря такому способу введения, обеспечивается более быстрое проникновение препарата в цитоплазму и ускоренная реакция соответствующих *компартментов*. По-видимому, за счет этого *уридин* стимулирует синаптическую передачу и активирует межнейрональные связи.

Действие психостимуляторов на межнейрональные отношения

В первые 30 мин после введения фенамина (10 мг/кг), то есть в условиях функционального возбуждения нейронов сенсомоторной коры, значительно возрастает число набухших и делящихся митохондрий в цитоплазме и отростках клеток. В этот период особый интерес вызывают случаи образования митохондриями эндоцитозных инвагинаций (рис. 5.28).

В отростках нервных клеток среди хорошо сохраненных многочисленных микротрубочек встречаются фигуры деления митохондрий. Иногда в некоторых органеллах видны деструктивные изменения наружных и внутренних мембран, что указывает на необратимый характер сдвигов. Через 3 и 24 ч после введения фенамина набухшие митохондрии практически не встречаются; в этот период в большом количестве регистрируются мелкие осмифильные митохондрии. Функциональная стимуляция фенамином приводит в первые 30 мин к резкой активации белоксинтезирующего аппарата. Меньшая часть клеток реагирует прямо противоположно, что может быть связано с исходным функциональным состоянием нейронов и уровнем афферентации, зависящей от количества активных синапсов [5].

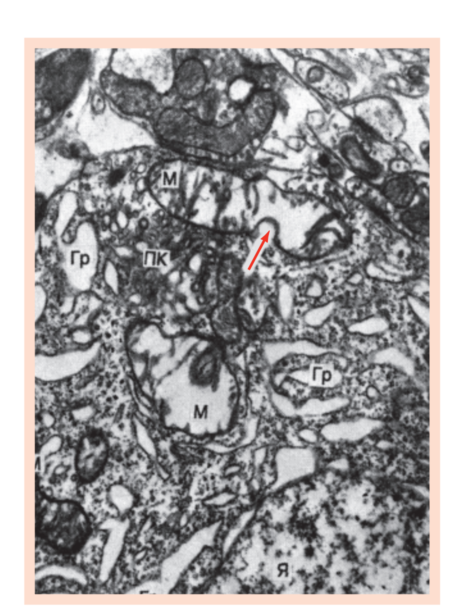
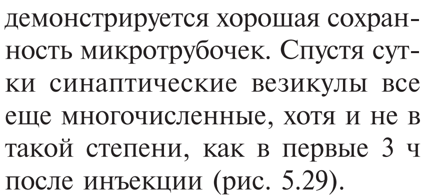


Рис. 5.28. Фрагмент цитоплазмы нервной клетки с резко набухшими митохондриями и расширенными цистернами ретикулума. Виден микрофагоцитоз митохондрий (стрелка) (ув. 10 000)

NB! Образование окаймленных везикул, сопряженное с расходованием нейрональной плазмолеммы, вызывает ответную компенсаторную реакцию в виде формирования субповерхностных цистерн.

Опосредованный рецепторами эндоцитоз, удерживающийся через сутки, свидетельствует о длительной циркуляции фенамина и медленном его выведении из организма. В фазе функционального возбуждения, сопровождающегося двигательной стереотипией, пресинаптические отростки содержат многочисленные синаптические пузырьки. Частой находкой являются синаптические мембраны с несколькими активными зонами, в области которых концентрируются везикулы. Чаще, чем в контроле, регистрируются аксошипиковые синапсы с хорошо развитым шипиковым аппаратом (рис. 5.29). Характерной особенностью различных синапсов является то, что митохондрии в синаптических терминалях отличаются высокой плотностью матрикса, хотя в нейронах, как отмечалось, они набухают, в дендритах они также выглядят набухшими. В период после действия фенамина, как и в фазе возбуждения,



демонстрируется хорошая сохранность микротрубочек. Спустя сутки синаптические везикулы все еще многочисленные, хотя и не в такой степени, как в первые 3 ч после инъекции (рис. 5.29).

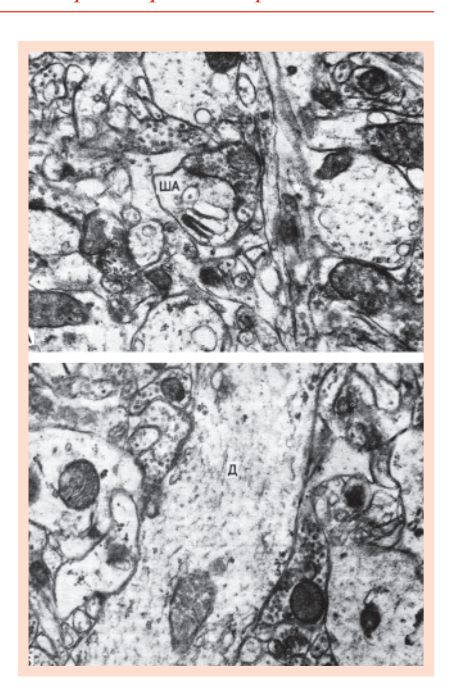
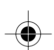


Рис. 5.29. Ультраструктурные изменения синаптического аппарата при введении фенамина. А – аксошипиковый синапс с расширенными структурами шипикового аппарата. Ув. 14 000. Б – группа аксодендрических синапсов с многочисленными синаптическими везикулами в аксоплазме (ув. 14 000)

Таким образом, ультраструктурная перестройка синаптических аппаратов отражает высокую функциональную *активность синапсов* и свидетельствует об усилении пресинаптической афферентации. Активация межнейрональных связей коррелирует со сдвигами нейронных ансамблей в соответствующие периоды *фенаминового возбуждения*.




Характерной особенностью действия *фенамина* на капилляры является резкое истончение эндотелиальной выстилки, не превышающей в отдельных участках поперечника базальной мембраны (рис. 5.30). Уплощение эндотелиальных клеток способствует *дестабилизации гематоэнцефалического барьера* и возможному повышению сосудистой проницаемости. В гиппокампе стимулирующее действие *фенамина* на функциональные элементы в первые 30 мин после инъекции в дозе 3 мг/кг сходно с таковыми в сенсомоторной коре, но уступает ему по выраженности. Через 3 ч качественно новым признаком является резкое повышение плотности митохондрий.

NB! Энергизированные формы митохондрий характеризуются прочным сопряжением процессов окисления и фосфорилирования.

Энергизированные митохондрии часто встречаются в цитоплазме глиоцитов, а также в дендритах, где они нередко подвергаются делению (рис. 5.31).

Внедрение *фенамина* вызывает резкое набухание только в *клетках-зернах*. Интересно, что в первые полчаса окаймленные везикулы в них, а также в клетках Пуркинье весьма немногочисленны. В этот период именно в клетках-зернах наблюдается микрофагоцитоз мито-

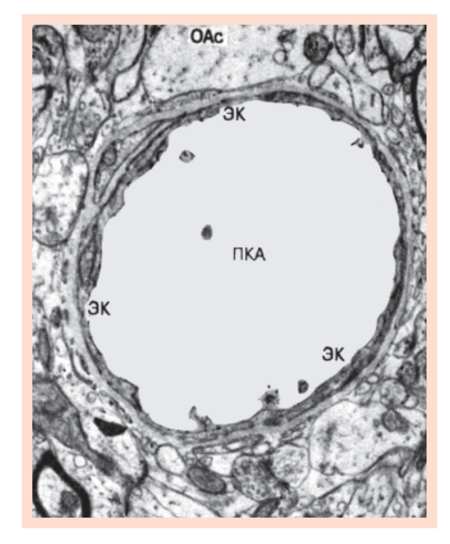


Рис. 5.30. Капилляр с истонченными эндотелиальными клетками (ув. 7000)

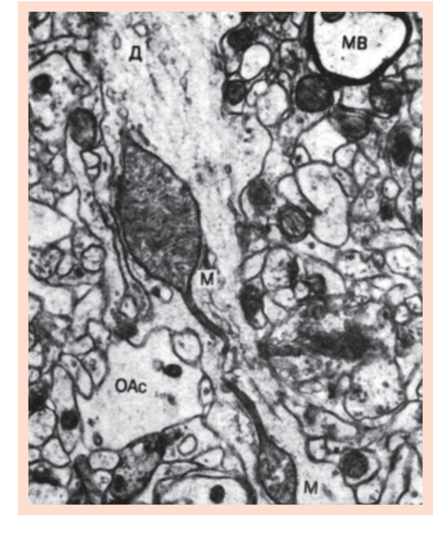
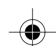


Рис. 5.31. Деление митохондрий в дендрите при действии фенамина (ув. 10 000)




хондрий, описанный также в нейронах сенсомоторной коры. Несмотря на слабовыраженный опосредованный рецепторами эндоцитоз, все же происходит прямое взаимодействие *фенамина* со структурами мозжечка. При этом в клетках Пуркинье изменяется *белоксинтезирующий* аппарат, а в клетках-зернах – *энергетический* аппарат. По-видимому, эти различия в реагировании объясняются функциональной специализацией клеток, о чем упоминалось выше.

Через 3 и 24 ч развертывается картина, характерная для выраженного опосредованного рецепторами эндоцитоза, когда образуются многочисленные окаймленные везикулы, *вторичные лизосомы* и *мультивезикулярные тельца*. Пожалуй, наибольший интерес представляют несинаптические межнейрональные контакты, которые довольно широко распространены в ЦНС. Эти контакты носят характер десмоподобных структур и выявлены в мозжечке между дендритами клеток-зерен, перикарионами звездчатых клеток, аксонами корзинчатых клеток Пуркинье. Спустя сутки после введения фенамина многократно возрастает число контактов между дендритами (рис. 5.32).

Контакты обычно точечные или небольшой протяженности, в местах контактов имеются симметричные уплотнения.

Интересно, что расстояние между контактирующими мембранами зависит от протяженности десмосомной зоны: с увеличением последней мембранное пространство сужается. В нервном окончании, об-

разующем аксодендритические синапсы, помимо синаптических пузырьков, иногда можно наблюдать окаймленные везикулы.

Ультраструктурные изменения структур ЦСВ сопровождаются перестройкой, свойственной таковой при психосимулирующем действии *фенамина.* Судя по реакции образования окаймленных везикул, активации лизосомного аппарата и мультивезикулярных телец, фенамин «входит» в клетку и вызывает различные варианты адаптации и дезадаптации. В частности, изменения белоксинтезирующего аппарата отражают развитие дистрофических процессов в нейронах и идут по дезадаптивному пути с явным структурно-функциональным дефектом. Ультраструктурные сдвиги в митохондриях преимущественно адаптивные, что проявляется в образовании многочисленных мелких органелл в перикарионе и особенно дендритах (рис. 5.33).

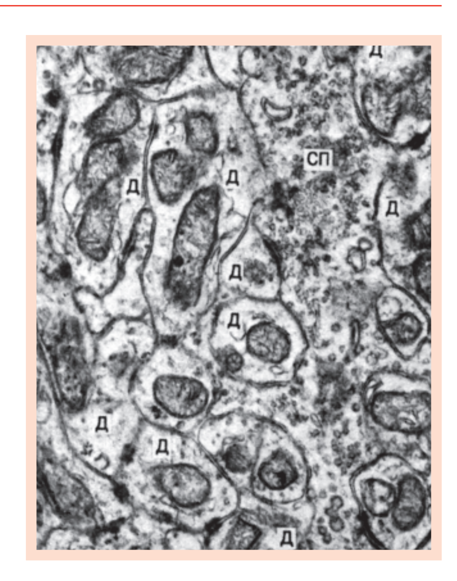
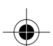


Рис. 5.32. Аксодендритические и дендродендрические синапсы. (ув. 14 000)




По нашему мнению, особо следует отметить реакцию лизосомного аппарата различных клеток и их роль в развитии деструктивных процессов в структурах ЦСВ. В связи с высокой проницаемостью эндотелия, вызванной введением *фенамина*, активируются лизосомы нервных, глиальных и соединительнотканных клеток. Подобная активация может иметь далеко идущие последствия, особенно если она происходит в непосредственной близости от плазматической мембраны (рис. 5.34).

Итак, под действием *фенамина*, *во-первых*, значительно повы-

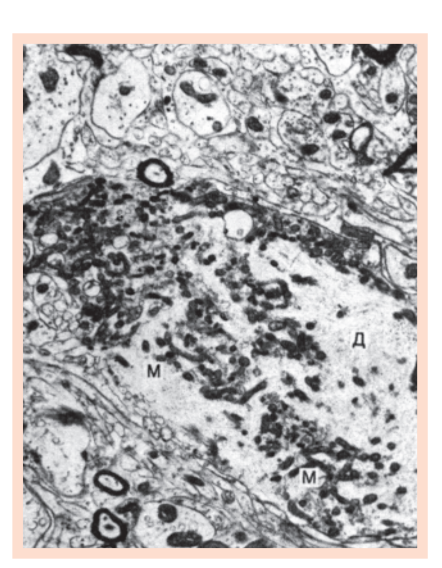


Рис. 5.33. Появление многочисленных мелких митохондрий в дендрите (ув. 56000)

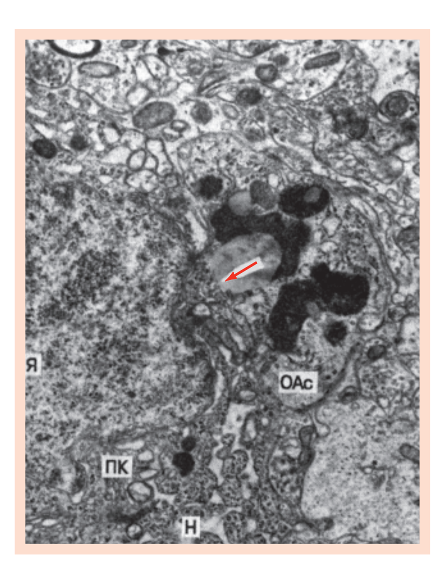
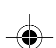


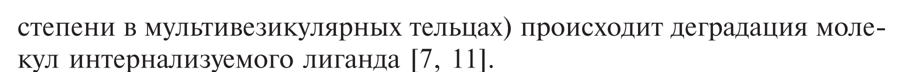
Рис. 5.34. Активация протеолиза в отростке астроцита и образовании прямого сообщения с нейроном (стрелка) (ув. 7000)




шается проницаемость капилляров (в сенсомоторной коре — за счет истончения эндотелиальной выстилки, в остальных образованиях — за счет альтераций эндотелиальных клеток или усиления специфического и неспецифического эндоцитоза). *Во-вторых*, нейроны всех исследованных отделов мозга реагируют на препарат образованием окаймленных везикул (опосредованный рецепторами эндоцитоз). *В-третьих*, *фенамин* вызывает мощную и пролонгированную активацию аппаратов энергетики и белкового синтеза с последующим нарушением пластических процессов в нейронах. *В-четвертых*, благодаря активации лизосом возможно установление прямых коммуникаций между нервными клетками и перинейрональными сателлитами. *В-пятых*, фенаминовая стимуляция синаптических и несинаптических взаимодействий между нейронами отличается важной особенностью — отсутствием повреждений аппаратов связи, что обеспечивает стабильное функционирование нейронных ансамблей.

Спраутинг-феномен ноотропных средств

Инъекции *пирацетама* в дозе 30 мг/кг вызывают в сенсоматорной области коры больших полушарий отчетливое увеличение ядер и ядрышек и смещение последних к кариолемме. Одновременно в первые 30 мин отмечается извилистый ход ядерной оболочки и глубокие вдавления в кариоплазму. Совокупность этих изменений указывает на нарушения ядерно-цитоплазматических отношений. В цитоплазме нервных клеток наблюдается увеличение размеров митохондрий с просветлением матрикса, расширение канальцев ретикулума и свободных рибосом. Число окаймленных везикул не изменяется, однако через 3 ч они становятся более многочисленными. В этот период резко усиливается протеолиз (рис. 5.35), что можно связать с усилением специфического эндоцитоза. Как известно, именно в лизосомах (в меньшей



степени в мультивезикулярных тельцах) происходит деградация молекул интернализуемого лиганда [7, 11].

Поскольку *пирацетам* легко проникает через гематоэнцефалический барьер, составной частью которого являются отростки астроцитов, клетки астроглии первыми реагируют на препарат и в какой-то степени взаимодействуют с ним. Показателем этого является мощная реакция протеолиза, возникающая там в первые 30 мин (рис. 5.36). Затем она «угасает» и «эстафета» активации лизосомного аппарата передается нейронам, где также возрастает количество вторичных лизосом.

NB! Наиболее примечательным результатом данной серии экспериментов является обнаруженный нами феномен так называемого *спраутинга*, когда при действии пирацетама образуются *новые межнейрональные связи* (рис. 5.37).

В гиппокампе, как и в сенсомоторной коре, отмечается свойство пирацетама вызывать *аксональный спраутинг*. Однако этот феномен сдвинут во времени и регистрируется через 30 мин после инъекции. В течение суток удерживается активация синаптического аппарата, причем нередко встречаются дендриты, контактирующие одновременно с несколькими аксонами. Под действием *пирацетама* в нейронах гиппокампа заметно увеличивается число окаймленных везикул и в связи с постоянно продолжающимся их образованием происходит формирование субповерхностных цистерн, идущих на восста-





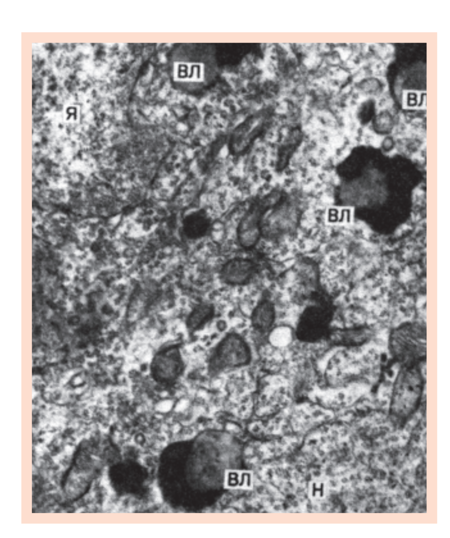


Рис. 5.35. Фрагмент цитоплазмы нервной клетки с многочисленными вторичными лизосомами (ув. 10 000)

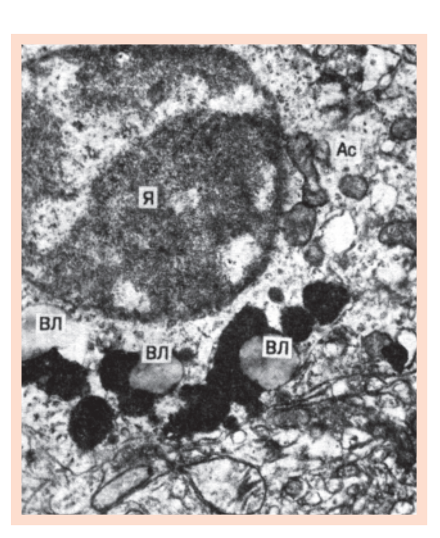
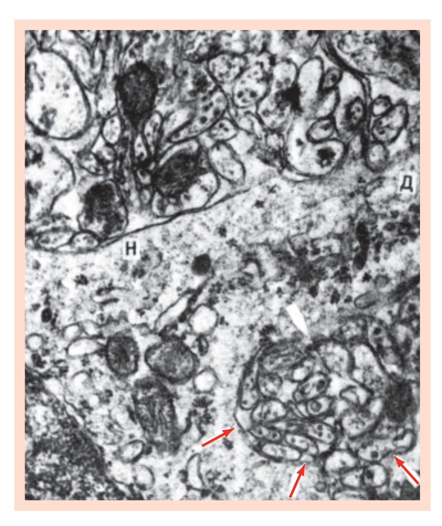


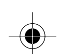
Рис. 5.36. Астроцит с большим количеством вторичных лизосом (ув. 10 000)



5.37. Появление многочисленных новообразованных контактов (феномен спраутинга), *стрелки* (ув. 14 000)

новление плазматической мембраны. Интересно, что в условиях истощения протеолиза их функцию берут на себя мультивезикулярные тельца.

В капиллярах особых изменений нет, однако иногда наблюдается периваскулярный отек, имеющий характерные черты, связанные с особенностями гематоэнцефалического барьера (рис. 5.38). При электронно-микроскопическом изучении ЦСВ обращает на себя внимание необычайно высокая активность лизосом в нейронах, астроцитах и перицитах в первые 30 мин после введения пирацетама. В последующем она несколько снижается, а спустя сутки возвращается к исходному уровню. В первые 3 ч документируются признаки умеренной активности структур, связанных с синтезом белка и энергетической функцией.



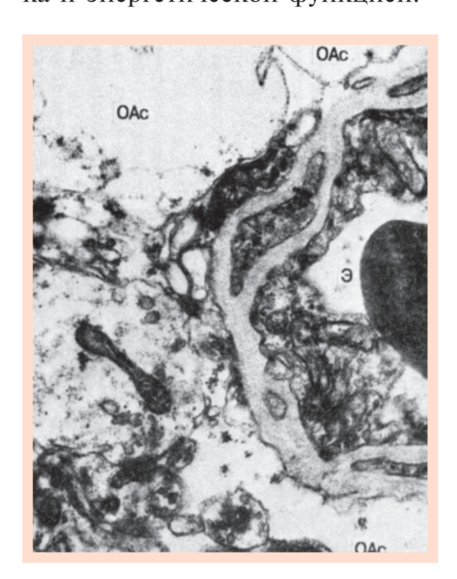
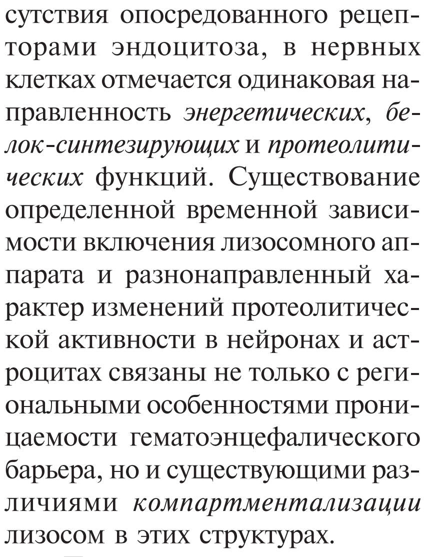



Рис. 5.38. Фрагмент капилляра, окруженного отростками астроцитов (ув. 18 000)

С нашей точки зрения, наиболее интересным фактом является уникальная реакция ядрышек, заключающаяся в выходе их в цитоплазму нейронов (рис. 5.39).

NB! Передислокация ядрышек в цитоплазму, по-видимому, представляет собой компенсаторную реакцию, связанную с одномоментным форсированным выбросом рибонуклеопротеидных частиц и последующей деградацией гранулярного вещества на полисомные комплексы.

Таким образом, следует отметить наличие *специфических рецепторов* к препарату во всех изученных нами участках, кроме таламуса. Независимо от наличия или от-



сутствия опосредованного рецепторами эндоцитоза, в нервных клетках отмечается одинаковая направленность *энергетических*, *белок-синтезирующих* и *протеолитических* функций. Существование определенной временной зависимости включения лизосомного аппарата и разнонаправленный характер изменений протеолитической активности в нейронах и астроцитах связаны не только с региональными особенностями проницаемости гематоэнцефалического барьера, но и существующими различиями *компартментализации* лизосом в этих структурах.

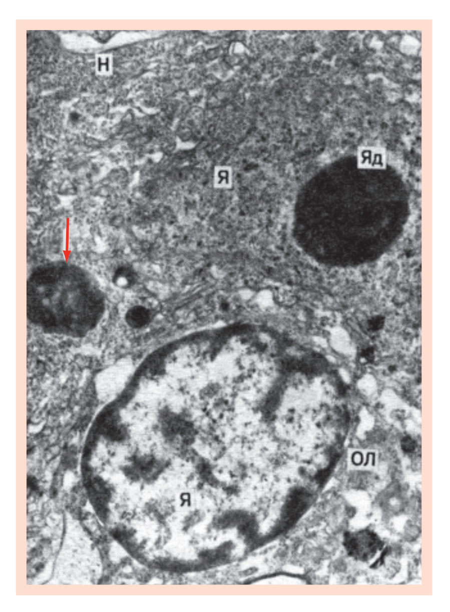
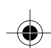
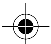


Рис. 5.39. Появление ядрышкоподобного тельца (стрелка) в цитоплазме нейрона (ув. 5600)

Пирацетам, не вызывая необратимых сдвигов в системе микроциркуляции; тем не менее лабилизирует сосудистую стенку и повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера; в эндотелии изменения отсутствуют.

Нейроны реагируют постепенной активацией, которая наиболее выражена к концу первых суток. При введении *пирацетама* впервые установлена компенсаторная реакция выталкивания ядрышка в цитоплазму. Особенно выражена ультраструктурная перестройка синаптического аппарата, отражающая высокую степень активности *межнейрональных контактов*. Интересно, что длительное возбуждение аппаратов нервной передачи не сопровождается деструкцией синапсов.

Галлюциногенные альтерации ультраструктур нейронов

Ультраструктурный анализ влияния некоторых нейропсихотропных галлюциногенных препаратов (*глюпепта* в дозе 5 мг/кг и *психогала* в дозе 0,1 мг/кг) на различные отделы ЦНС позволил выявить интересные закономерности.

Необходимо подчеркнуть, что реакция энергетического и белоксинтезирующего аппаратов нейронов отличается полиморфизмом. Так, если в нервных клетках *соматосенсорной коры* и *гипоталамуса* доминируют процессы активации белкового синтеза, то в нейронах

полосатого тела они выражены значительно слабее, а в *гиппокампе* даже угнетены.

Особого внимания заслуживает четкая зависимость между содержанием в цитоплазме окаймленных везикул и активацией протеолиза. Действительно, чем больше их в клетках, тем интенсивнее активация протеолитических процессов, о чем можно судить по наличию многочисленных *вторичных лизосом* (аутофаголизосом). Одновременно удается наблюдать ассоциации из первичных лизосом и мультивезикулярных телец, находящихся в непосредственной близости к пластинчатому комплексу (рис. 5.40).

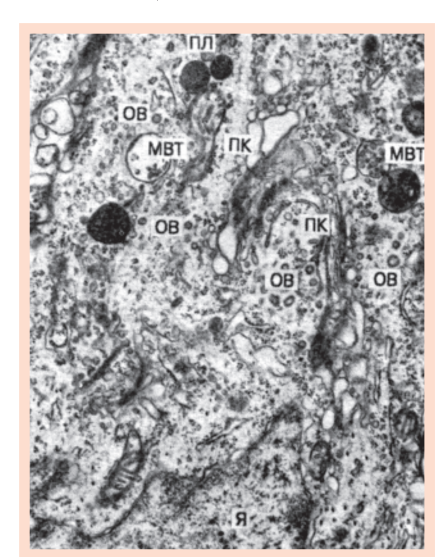


Рис. 5.40. Фрагмент цитоплазмы нейрона с гиперплазированным пластинчатым комплексом, многочисленными окаймленными везикулами и лизосомами. Видна ассоциация первичной лизосомы и мультивезикулярного тельца (ув.1000)

Поскольку размеры их примерно одинаковы, а везикулы нередко содержат материал, по плотности сходный с лизосомным матриксом, то вполне можно допустить *трансформацию* мультивезикулярных телец в лизосомы.

Введение психотомиметиков *глюпепта* и *психогала* позволило обнаружить одинаковую реакцию, связанную с усилением образования окаймленных везикул, особенно выраженную в нейронах всех изученных отделов, за исключением клеток гипоталамуса. Специфическое взаимодействие психотомиметиков на нейрональной плазмолемме с рецепторами, их интернализация в цитоплазму, последующая деградация с участием лизосом и/или мультивезикулярных телец, по-видимому, в немалой степени обусловливают сходство и различие при действии этих препаратов.

NB! *Деструктивные изменения* в синапсах под влиянием *психогала*, и особенно выраженные при введении *глюпепта*, преобладают над явлениями адаптивной перестройки в них и могут лежать в основе *нарушения интегративной деятельности мозга*.

Изменения синаптического аппарата при действии *психогала* обратимы и менее выражены. Что касается клеток нейроглии, то особое внимание мы уделили астроцитам и олигодендроцитам. Оказалось, что

глюпепт в астроцитах сенсомоторной коры, полосатого тела и гиппокампа изменений не вызывает; эти клетки выглядят отечными в мозжечке, а в гипоталамусе их цитоплазма содержит множество вторичных лизосом. Сходная по направленности реакция наблюдается в олигодендроцитах стриатума, а в сенсомоторной коре и гипоталамусе — вакуольная дистрофия. *Психогал,* напротив, оставляет интактными клетки олигодендроглии и особенно резко активирует протеолиз в астроцитах сенсомоторной коры (рис. 5.41).

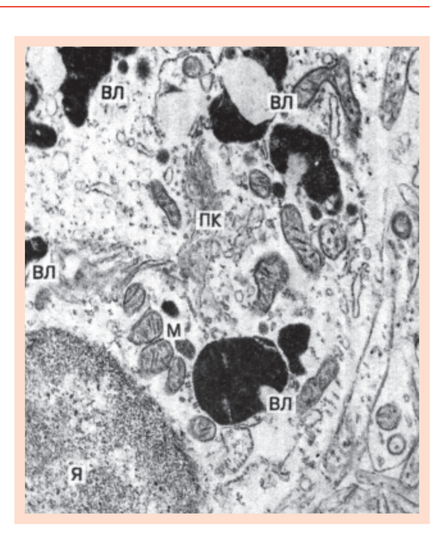


Рис. 5.41. Астроцит с многочисленными вторичными лизосомами (ув. 8000)

В более отдаленные периоды наблюдений (до 2 суток) ультраструктурные сдвиги возникают только при использовании *глюпепта.* Так, в клетках Пуркинье мозжечка регистрируется феномен микрофагоцитоза митохондрий участков цитоплазмы. Как видно из рис. 5.42, от митохондрии отходят две смыкающиеся между собой псевдоподии, ограничивающие участок, содержащий полисомные комплексы и мелкие единичные везикулы. По сравнению с остальной цитоплазмой эта зона выглядит менее электронно-плотной.

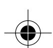





Рис. 5.42. Микрофагоцитоз митохондрий (стрелка) участка цитоплазмы в клетке Пуркинье (ув. 10 000)

Изменения синаптического аппарата отличаются мозаичностью нарушений и характеризуются наличием отчетливой границы между зонами повреждения: *альтерации* выявляются на верхних «этажах» исследуемых отделов мозга в неокортексе и гиппокампе и практически отсутствуют в гипоталамусе и мозжечке. Периоды максимальной выраженности стимулирующего действия пептида будут совпадать с повышени-

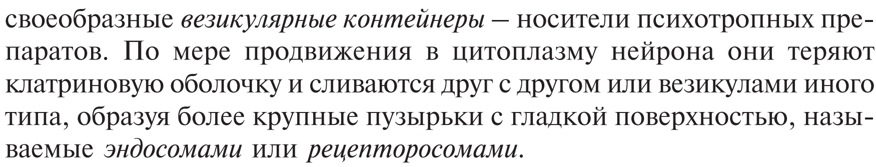
ем функциональной активности нейронных ансамблей, и, наоборот, депрессия может быть связана с развитием дегенеративных нарушений синаптических приборов.

Таким образом, необходимо в первую очередь подчеркнуть способность *глюпепта* и *психогала* к прямому взаимодействию с нейронами. Удалось установить не только возможность проникновения их по внеклеточным пространствам и «адрес» доставки, но и характер ответа соответствующего «адресата». Транснейронный перенос микромолекул пептидов (судя по реакциям образования окаймленных везикул) отчетливо заметен почти во всех изученных нами областях головного мозга, а через 2 суток снижается до фоновых величин. К этому времени к явлениям *микропиноцитоза* присоединяется эндоцитоз на органоидном уровне, то есть *микрофагоцитоз*, и хотя количественное выражение этих процессов затруднительно, сам факт качественной перестройки на ультраструктурном уровне имеет принципиальное значение. Он выявляет альтерирующее или повреждающее влияние галлюциногенов на ультрастуктуры головного мозга.

Лиганд-рецепторная транслокация и психоунитропизм

Рассматривая полученные данные в аспекте психоунитропизма лекарственных средств, можно констатировать проникновение всех психотропных препаратов в нервную клетку путем эндоцитоза. Процесс *транслокации лигандов* в нервную клетку начинается с того, что они взаимодействуют с рецепторами на нейролемме. Этот вид эндоцитозного поглощения, или опосредованный рецепторами эндоцитоз, отличается по количественным и качественным показателям от эндоцитоза молекул, лишенных сродства к плазматической мембране, и поглощение происходит в соответствии с принципом градиента концентрации (объемный или жидкофазный эндоцитоз) [10, 11, 12, 23, 39]. Вслед за первым этапом взаимодействия, когда происходит связывание психотропных препаратов со специфическими рецепторами на клеточной поверхности, комплексы лигандов образуют на плазмолемме скопления (или *кластеры*), располагающиеся в местах окаймленных углублений (coated pits).

Окаймление на внутренней поверхности мембраны представляет собой фибриллярный белок, названный *клатрином*. *Следующим этапом* является проникновение психотропных препаратов в места окаймленных углублений, которые быстро инвагинируют в нейрон во время эндоцитоза. В результате образуются окаймленные пузырьки –



своеобразные *везикулярные контейнеры* – носители психотропных препаратов. По мере продвижения в цитоплазму нейрона они теряют клатриновую оболочку и сливаются друг с другом или везикулами иного типа, образуя более крупные пузырьки с гладкой поверхностью, называемые *эндосомами* или *рецепторосомами*.

Данные о судьбе рецепторов и лигандов удалось установить методом электронно-микроскопического анализа [24]. В опытах с двойной меткой гепатоцитов частицами золота неодинакового размера при инкубации срезов сначала с антителами против лиганда (гликопротеид с терминальной галактозой), а затем с антителами против соответствующего рецептора оказалось возможным идентифицировать везикулярно-тубулярную систему CURL [1, 2, 26, 27, 52]. По-видимому, именно там происходят диссоциация рецептора и лиганда, а также их перераспределение, в результате чего *лиганды* сосредотачиваются в *везикулярной* части CURL, а *рецепторы* – в *тубулярном* отделе. Везикулярный фрагмент CURL с лигандом оказывается объектом агрессии лизосом и встроенных в них ферментов, а тубулярный участок, нагруженный рецепторами, ампутируется от системы CURL, и таким образом рецепторы, избежав протеолиза, *возвращаются* на поверхность клетки. Сходная по направленности реакция наблюдается, например, при морфинной интоксикации [12].




Мы предполагаем, что в некоторых случаях кинетика связывания психотропных препаратов с рецептором и механизмы передачи сигнала жестко не детерминированы и, по-видимому, в силу стохастичности биологических процессов могут проходить по запасному *альтернативному* пути. Такое допущение вполне вероятно, поскольку данный путь осуществляется довольно быстро и более экономичен для энергетики клетки [46, 52]. Данные авторов, полученные *in vitro*, можно с известной осторожностью экстраполировать на результаты наших исследований.

NB! Обнаруженное нами перемещние мультивезикулярных телец к аппарату Гольджи и зоне максимальной концентрации окаймленных везикул связано, возможно, с сортировкой комплексов лиганд-рецептор, заключенных в *везикулярные контейнеры*, часть из которых транспортируется по запасному пути.

Нами *визуализирована* способность психотропных препаратов к прямому взаимодействию с нейронами. Внутрижелудочковое введение их в обход гематоэнцефалического барьера позволяет установить возможность прямого контакта лекарств с соответствующими рецепторами на нейрональной плазмолемме, о чем можно судить по наличию многочисленных окаймленных везикул. Транснейронный пере-

нос молекул психотропных препаратов (судя по реакции усиления *специфического эндоцитоза*) отчетливо заметен почти во всех изученных образованиях.

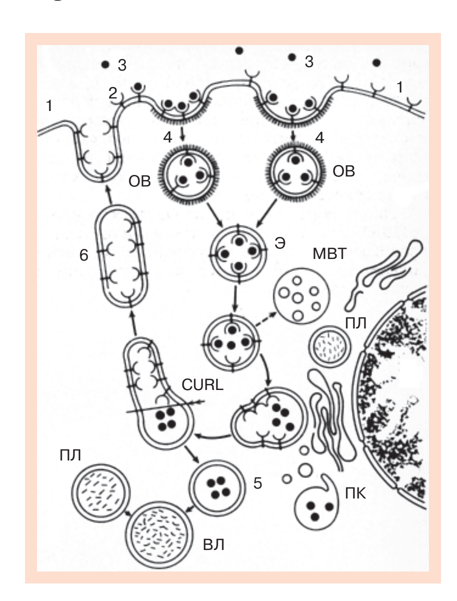
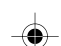


Рис. 5.43. Взаимодействие лиганда и рецептора. 1 – плазмолемма нейрона; 2 – рецептор; 3 – лиганд; 4 – окаймленное углубление; 5 – везикулярная часть системы CURL; 6 – тубулярная часть системы CURL. Сплошная стрелка – альтернативный путь взаимодействия лиганда с участием мультивезикулярного тельца (МВТ); двойная стрелка – место разделения на везикулярную и тубулярную части в системе CURL. ОВ – окаймленные везиулы; Я – ядро; ПЛ – первичная лизосома; ВЛ – вторичная лизосома; ПК – пластинчатый комплекс; CURL – место разделения рецептора и лиганда; Э – эндосома




Таким образом, процесс эндоцитоза складывается из ряда последовательных этапов: *кластеризации* комплекса психотропный препарат-рецептор, *интернализации* комплексов с образованием окаймленных везикул, *диссоциации* лигандов и разрушения их в лизосомах или мультивезикулярных тельцах, *рециклирования* рецепторов. Внутринейрональная сортировка лигандов-рецепторов осуществляется в особых везикулярно-тубулярных компартментах, являющихся производными пластинчатого комплекса. Все эти процессы представлены на рис. 5.43 в отношении лекарств, ксенобиотиков, а также токсинов, к которым мы относим и галлюциногены.

По современным представлениям, в цитоплазме клеток существует специальный *механизм возврата рецепторов*, направленный на восстановление и поддержание клеточной поверхности [24]. Однако остается неясным: все ли рецепторы возвращаются на исходные позиции и достаточно ли одного рециклирования мембран для восстановления протяжности плазмолеммы? За счет чего она реставрируется при формировании миелиноподобных структур? Существует мнение [11, 26, 44], что было бы весьма расточительно, если бы клетки восстанавливали свои мембранные структуры, синтезируя их *de novo*. Следовательно, в нейронах должны существовать какие-то дополнительные возможности, компенсирующие убыль плазматической мембраны.



NB! Нами установлена особая роль *субповерхностных цистерн* – уникальной структуры, характерной только для нервной ткани и ее адаптерных белков.

Интернализация *диазепама* в цитоплазму нервных клеток приводит к возникновению прямых сообщений с астроцитами, что зарегистрировано в сенсомоторной коре и гиппокампе. Ранее непосредственные коммуникации были обнаружены нами в таламической области при введении *галоперидола* и в сенсомоторной коре при введении *фенамина* [5, 6]. Обычно они проявляются через 3 часа после инъекции, хотя могут формироваться и через сутки. Образование межклеточных сообщений мы рассматриваем как адаптивную реакцию, направленную на восстановление метаболических нарушений в нейронах. При этом не исключается также транспорт окаймленных везикул, содержащих тот или иной лиганд, из нейронов в астроциты, а возможно, и в обратном направлении. Следовательно, если оставить в стороне все еще гипотетические причины установления новых форм связей этими клетками, следует признать принципиальную возможность их образования, выявляемую на ультраструктурном уровне.



NB! Полученные факты дают основание предположить, что в процессе манифестации психотропного эффекта нейролептики, психостимуляторы, транквилизаторы и ноотропы обладают способностью вызывать формирование альтернативных межклеточных взаимоотношений.



Особый интерес представляет информация о том, что, по крайней мере, три важные группы лекарственных средств взаимодействуют не только с нейронами, но и с астроцитами. Известно, что к нейролептикам, барбитуратам и бензодиазепинам на клетках *астроглии* имеются соответствующие *рецепторы*. Однако столь неожиданное заключение явно противоречит традиционным представлениям о принадлежности рецепторов исключительно к нервным клеткам. Между тем у нейрофармакологов нет сомнения относительно наличия *астроцитарной рецепторики*, хотя они ранее не были подкреплены соответствующими электронно-микроскопическими наблюдениями.

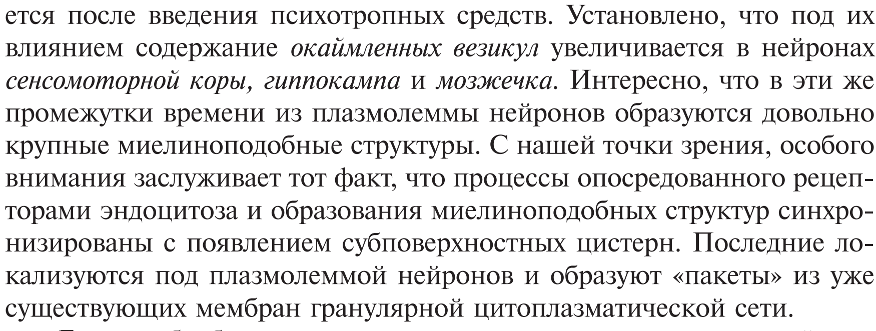
Считают, что благодаря различиям между бензодиазепиновыми рецепторами возможен синтез препаратов с определенными селективными свойствами. Полагают, что один из этих рецепторов обеспечивает анксиолитические эффекты бензодиазепинов, а другой – седативное действие. Естественно, что препараты, специфически взаимодействующие с теми или иными типами рецепторов, открывают новые возможности в терапии. Что касается соответствия изменения поведенческих реакций каждому из этих типов рецепторов, то они пока остаются неясными.

Таким образом, резюмируя общие представления об *унитропных рецепторах*, следует в первую очередь выделить существование ряда типов рецепторных белков, с возможностью локализации рецепторов на клетках астроглии. В настоящее время не известно, какой из типов бензодиазепиновых рецепторов, связан с плазмолеммой астроцитов и как они изменяются под влиянием диазепама и других анксиолитиков, а также нейролептиков, антидепрессантов и психостимуляторов.

Сопоставляя влияние *уридина* и *пирацетама* на ультраструктуру функциональных элементов различных отделов мозга, необходимо разграничить сходства и различия в действии этих препаратов. Общность заключается в том, что для них имеются соответствующие специфические рецепторы на нейрональной плазмалемме в сенсомоторной коре, гиппокампе и ЦСВ. В таламической области нейроны практически не содержат их, о чем можно судить по отсутствию реакции образования окаймленных везикул. Дальнейшая судьба *везикул-контейнеров*, нагруженных тем или иным лигандом, также одинакова: деградация содержимого осуществляется в лизосомах (*основной путь*) или в мультивезикулярных тельцах (*хелперный*, или вспомогательный путь). Наконец, в ответ на дефицит нейролеммы в обоих случаях возникает компенсаторная реакция в виде формирования субповерхностных цистерн.

Различия в действии указанных препаратов на сенсомоторную область коры заключаются в стимулирующем влиянии *пирацетама* на метаболизм нейронов, активации синаптических аппаратов и способности вызывать *спраутинг* отростков нервных клеток. В гиппокампе в ответ на введение *уридина* возникают реактивные изменения внутриклеточных органелл, которые в различные периоды последействия препарата сопровождаются сдвигами адаптивного и дезадаптивного характера. При введении *пирацетама* в гиппокампе, как и в сенсомоторной коре, регистрируется отчетливый *спраутинг*. Выявляется также определенная временная зависимость между реакцией образования окаймленных везикул, формированием субповерхностных цистерн и включением в протеолиз лизосом и мультивезикулярных телец. Асинхронность включения лизосомного аппарата нервных клеток и астроцитов обусловлена особенностями проницаемости гематоэнцефалического барьера в различных отделах мозга. В ЦСВ *уридин* специфически связывается с мембранами эндотелиальных и нервных клеток.

В контрольных экспериментах при внутрижелудочковом введении изотонического раствора хлорида натрия субповерхностные цистерны в нейронах и дендритах *не обнаружены*. Необходимо еще раз подчеркнуть, что в интактном мозге они относятся к разряду относительно редко встречающихся внутринейрональных структур. Иная картина наблюда-



ется после введения психотропных средств. Установлено, что под их влиянием содержание *окаймленных везикул* увеличивается в нейронах *сенсомоторной коры, гиппокампа* и *мозжечка*. Интересно, что в эти же промежутки времени из плазмолеммы нейронов образуются довольно крупные миелиноподобные структуры. С нашей точки зрения, особого внимания заслуживает тот факт, что процессы опосредованного рецепторами эндоцитоза и образования миелиноподобных структур синхронизированы с появлением субповерхностных цистерн. Последние локализуются под плазмолеммой нейронов и образуют «пакеты» из уже существующих мембран гранулярной цитоплазматической сети.

Говоря об общих принципах ультраструктурных изменений при действии изученных психотропных препаратов, подтверждающих нашу *концепцию унитропизма*, следует сразу же разграничить их с эффектами растительного токсина *глюпепта*, действующего как РИБ II. Наряду с деструктивными изменениями в синапсах, а значит нарушением системной деятельности мозга (на то он и галлюциноген!), отечностью астроцитов в мозжечке и гипоталамусе, резко возрастают явления вакуольной дистрофии и активации протеолитических процессов.



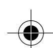

По-видимому, значительная часть *аутофаголизосом* возникает за счет трансформации мультивезикулярных телец в лизосомы (рис. 5.43). Это согласуется с представлениями о механизмах токсичности белков типа РИБ II. Проведем аналогию с токсином *рицином*. Через час около 5% интернализованного рицина при 18-20 °С находится в термозависимом аппарате Гольджи (АГ), в эндосомах, но не в иных АГ и лизосомах. Токсин транспортируется минуя поздние эндосомы, а блокада в мутантных по Rab9 клетках движения М6Ф-рецептора не препятствует проявлению цитотоксического действия рицина [49]. Существует предположение, что гликолипиды, с которыми рицин связан в эндосомах, даже после освобождения от клеточного рецептора могут транспортировать токсин в АГ [42].

В отношении рицина существовали определенные трудности с детекцией в ЭР молекул токсина, меченных как пероксидазой, так и коллоидным золотом с помощью электронной микроскопии [42]. Попадание рицина в ЭР подтверждено биохимическим путем [39]. В клетках, мутантных по трем ГТФазам, а именно Rab1, ARF1, Sar1, предотвращалась интоксикация и ингибировалось цитотоксичность многих токсинов: рицина, модецина, абрина, вискумина, волкенсина и др. [14, 30, 49]. Предотвращалось собирание COPI оболочки, а именно эти белки отвечают за везикулярный транспорт между АГ и ЭР.

Транспорт рицина в ЭР идет через взаимодействие с рециркулирующим галактозсодержащим компонентом, таким, как *калретикулин*

(KDEL-несущий белок), который сам возвращается в ЭР через контакт с рециркулирующим KDEL-рецептором [31]. Предполагается, что именно COPI механизм лежит в основе ретроградного транспорта белков в ЭР. Одними из возможных кандидатов сортинга в COPI везикулы являются белки семейства p24 [38].

Несмотря на то, что многие механизмы внутриклеточного транспорта, включая ретроградный перенос лекарств, ксенобиотиков и пептидных токсинов, до настоящего времени не совсем понятны, использование принципов моделирования на ультрастуктурном уровне сулит большие перспективы в создании инновационных лекарств и токсикопротекторов. Безусловно то, что клеточная мембрана нейронов служит материалом для окаймленных везикул, поэтому в условиях массового образования их при действии психотропных препаратов создается своего рода дефицит поверхности клетки или «минус-мембрана». Кроме того, другой причиной возникновения эффекта «минус-мембрана» является формирование в цитоплазме нервных клеток и их отростках миелиноподобных структур, на построение которых также расходуется материал плазмолеммы и мембран различных органелл клетки. Хотя этот дефицит частично восполняется благодаря существованию своеобразного конвейера и рециклированию интернализованных мембран [24], тем не менее, требуются какие-то дополнительные механизмы, компенсирующие их убыль. По нашему мнению, образование пакетов гладких мембран в цитоплазме, последующая дислокация их к поверхности клетки и дальнейшее встраивание молекул фосфолипидов в плазмолемму и составляют основу восстановительного процесса, осуществляемого с помощью субповерхностных цистерн.



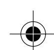

Таким образом, с помощью электронно-микроскопических исследований удается подтвердить наличие единых механизмов действия психотропных средств на уровне лиганд – рецептор. Мы рассматриваем полученные нами данные как еще одно доказательство в пользу *концепции унитропизма* и в качестве базы для создания инновационных лекарств, онко- и иммунотоксинов.

Литература

1. *Галыгин А.К., Латаш Л.Н.* Альтернативный путь взаимодействия лигандов и рецепторов в процессе эндоцитоза. – *Уфа: Изд-во ПИК, 2007.*
2. *Ефанов И.Н., Стрижов Д.К.* Ультрамикроскопические исследования CURL – механизмов рецепторов мозга // *Труды ВГУ, с. 27-32, 2006.*
3. *Захаров М.В., Кузнецов А.П., Поздняков Т.Г.* Адапторные белки и другие гетеротетрамеры мембранных рецепторов. – *М.: Грант+, 220 с., 2007.*
4. *Каркищенко Н.Н., Бардахчьян Э.А.* Ультраструктурные изменения различ-

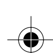
ных образований головного мозга, вызванные действием уридина // *Бюлл. эксп. биол. и мед., № 1, с. 86, 1990.*

5. *Каркищенко Н.Н., Макляков Ю.С., Бардахчьян Э.А.* Влияние фенамина на ультраструктурные изменения различных отделов головного мозга крыс // *Хим.-фарм. журнал, № 4, с. 10, 1991.*
6. *Каркищенко Н.Н., Макляков Ю.С., Бардахчьян Э.А.* Ультраструктурные основы действия галоперидола // *Ж. неврапатол. и психиатр. им. Корсакова С.С., т. 92, № 4, с. 81, 1992.*
7. *Каркищенко Н.Н., Макляков Ю.С., Бардахчьян Э.А.* Ультраструктурные особенности изменений некоторых отделов головного мозга крыс в условиях воздействия пирацетама // *Эксперим. и клин. фарм., № 6, 1992.*
8. *Каркищенко Н.Н., Солодилов В.В., Бардахчьян Э.А.* Ультраструктурные основы биологического действия синтетических аналогов энкефалинов. Сообщение 1. Роль субповерхностных цистерн // *Известия СКНЦ ВШ. Естественные науки, № 2, с. 121, 1987.*
9. *Каркищенко Н.Н., Солодилов В.В., Бардахчьян Э.А.* Ультраструктурные основы биологического действия синтетических аналогов энкефалинов. Сообщение 2. Роль окаймленных везикул // *Известия СКНЦ ВШ. Естественные науки, № 2, с. 122, 1987.*
10. *Каркищенко Н.Н., Хайтин М.И., Страдомский В.С.* Общие закономерности действия психотропных средств. // *Фармакология и токсикология, т.49, № 5, с. 45, 1986.*




11. *Каркищенко Н.Н.* Психоунитрпизм лекарственных средств. — *М.: Медицина, 208 с., 1993.*
12. *Морозов Г.В., Боголепов Н.Н.* Морфинизм. — *М.:Медицина, 158 с., 1984.*
13. *Abbott G.W., Sesti F., Splawski I. et al.* MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia // *Cell 1999;97:175-187.*
14. *Argent R.H., Roberts L.M., Wales R. et al* Introduction of a disulfide bond into ricin A-chain decreases the cytotoxicity of the ricin holotoxin // *J. Biol. Chem., V. 269, PP. 26705-26710, 1994.*
15. *Black A.J., McLeod H.L., Capell H.A. et al.* Thiopurine methyltransferase genotype predicts therapy-limiting severe toxicity from azathioprine. *Ann Intern Med 1998; 129:716-718.*
16. *Collwan J.F., Stangel M., Kuhn L.A. et al.* Trasferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn at the structrural recognition motif for endocytosis // *Cell, v. 63, pp. 1061-1072, 1990.*
17. *Dishy V., Sofowora G.G., Xie H.-G. et al.* The effect of common polymorphisms of the b_2-adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization // *N. Engl. J. Med.;345:1030-1035, 2001.*
18. *Ellert F.J., Roeske W.R., Braestru C. et.al.* The effect of drugs on the low densty brain-receptors // *Europ. J. P. Harm., vol .70, No. 4, p. 593-596, 1981.*
19. *Evans W.E., Hon Y.Y., Bomgaars L. et al.* Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine // *J. Clin. Oncol., 19:2293-2301, 2001.*

20. *Evans W.E., Johnson J.A.* Pharmacogenomics: the inherited basis for inter-individual differences in drug response // *Annu Rev Genomics Hum Genet 2001;2:9-39.*
21. *Evans W.E., Relling M.V.* Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics // *Science, 286:487-491, 1999.*
22. *Farlow M.R., Lahiri D.K., Poirier J. et al.* Treatment outcome of tacrine therapy depends on apolipoprotein genotype and gender of the subjects with Alzheimer's disease // *Neurology, 50:669-677, 1998.*
23. *Fujimoto M., Okabayashi T.* Functional properties and "Tight turn" connections of clathrin-coated endocytic vesicles // *Life Sciences, vol.30, No 1, pp.51-57, 2002.*
24. *Genze H.J., Slot J.W., Ley P.A. et.al.* Clathrinpinocytic pathways of protection of the brain // *J.Cell.Biol., vol.89, No 5, pp.653-655, 1984.*
25. *Gerdes L.U, Gerdes C., Kervinen K. et al.* The apolipoprotein epsilon 4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction // *Circulation, 101:1366-1371, 2000.*
26. *Itin C., Foguet M., Kappeler F., Klumperman J., Hauri H.P.* Recycling of the endoplasmic reticulum. Golgi intermediate compartment 107 protein ERGIC-53 in the secretory pathway // *Biochem. Soc. Trans., vol. 23, pp. 541-544, 1995.*
27. *Lamaze C., Schmid S.L.* The emergence of clathrinindependent pinocytic pathways // *Curr. Opin. Cell Biol., vol. 7, pp. 573- 580, 2005.*
28. *Le Borgne R., Hoflak B.* Mannose-6-phospate receptors regulate the formation of clathrin-coated vesicles in the TGN // *J.Cell Biol., vol. 137, pp. 335-345, 1997.*
29. *Liggett S.B.* Beta(2)-adrenergic receptor pharmacogenetics // *Am. J. Respir. Crit. Care Med., 161:S197-S201, 2000.*
30. *Llorente A., Rapak A., Schmid S. et al.* Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus // *J.Cell Biol., vol. 140, pp. 553-563, 1998.*
31. *Lord J.M., Roberts L.M.* The intracellular transport of ricin: why mammalian cells are killed and how Ricinus cells survive // *Plant Physiol Biochem., vol. 34 (2), pp. 253-261, 1996.*
32. *McLeod H.L, Evans W.E.* Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy // *Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001;41:101-121.*
33. *Melby E.L., Prydz K., Olsnes S., Sandvig K.* Effect of monensin on ricin and fluid phase transport in polarized MDCK cells // *J. Cell. Biochem., vol. 47, pp. 1-10, 1991.*
34. *Mellman I.* Endocytosis and molecular sorting // *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol., vol.12, pp. 575-625, 1996.*
35. *Miettinen H.M., Matter W., Hunziker J.K. et al.* Fc receptor endocytosis is controlled by a cytoplasmic domain determinant that actively prevents coated pit localization // *J. Cell. Biol., vol. 116, pp. 875-888, 1992.*
36. *Montesano R., Roth J., Robert A. et al.* Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxin // *Nature, vol. 296, pp. 548-559, 1982.*

37. *Mukherjee S., Ghosh R.N., Maxfield F.* Endocytosis // *Physiol. Reviews, vol. 77, pp. 759-803, 1997.*
38. *Ohno H., Stewart J., Fournier M.C. et al.* Interaction of tyrosinebased sorting signals with clathrin-associated proteins // *Science, vol. 269, pp. 1872-1875, 1995.*
39. *Rapak A., Falnes P., Olsnes S.* Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, pp. 3783-3788, 1997.*
40. *Relling M.V., Hancock M.L, Rivera G.K. et al.* Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus // *J Natl. Cancer Inst., 91:2001-2008, 1999.*
41. *Rodal S.K., Skretting G., Garred O. et al.* Extraction of cholesterol with methyl-b-cyclodextrin 114 perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles // *Mol. Biol. Cell, vol. 10, pp. 961-974, 1999.*
42. *Sandvig K.* Extraction of cholesterol with methyl-b-cyclodextrin 114 perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles // *Mol. Biol. Cell, vol. 10, pp. 961-974, 1999.*
43. *Schapiro F.B., Grinstein S.* Determinants of the pH of the Golgi complex // *J. Biol. Chemistry, vol. 275, pp. 21025-21032, 2000.*
44. *Schapiro F.B., Lingwood C., Furuya W., Grinstein S.* pHindependent retrograde targeting of glycolipids to the Golgi complex // *Am. J. Physiol., vol. 274, pp. 319-332, 2003.*


45. *Scherer P.E., Okamoto T., Chun M. et al.* Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, pp. 131-135, 1996.*
46. *Schlegel A. and Lisanti M.P.* Caveolae and their coat proteins, the caveolins: from electron microscopic novelty to biological launching pad // *J Cell Physiol. Mar, vol. 186(3), pp. 329-37, 2001.*
47. *Schmid S.L., Carter L.L.* ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells // *J. Cell Biol, vol. 111, pp. 2307-2318, 1990.*
48. *Siest G., Bertrand P., Herbeth B. et al.* Apolipoprotein E polymorphisms and concentration in chronic diseases and drug responses // *Clin Chem Lab Med, 38:841-852, 2000.*
49. *Simpson J.C., Dascher C., Roberts L.M. et al.* Ricin cytotoxicity is sensitive to recycling between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex // *J. Biol. Chem., vol. 270, pp. 20078-20083, 1995.*
50. *Spenser H.* The principle of Biology. – *London, vol. 2, p. 386, 1867.*
51. *Tang Z., Scherer P.E., Okamoto T. et al.* Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle // *J. Biol. Chem., vol. 271, pp. 2255-2261, 1996.*
52. *Yu G.F., Aldrich P.T.* Inhibition of coated and non-coated membrane invaginations with translocation to complex Golgi // *New J. Brain Res., vol. 8, No. 1-2, pp. 109-112, 2006.*